

Institut für Ernährungswissenschaften  
Fachbereich 09 – Agrarwissenschaften, Ökotoxikologie und Umweltmanagement  
Institut für organische Chemie  
Fachbereich 08 – Biologie und Chemie  
Justus-Liebig-Universität Giessen

# **Epithelialer Transport und immunologische Effekte von Gliadinpeptiden *in vitro***

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**Christian Zimmermann**

Gießen 2014

1. Gutachter: Prof. Dr. Silvia Rudloff
2. Gutachter: Prof. Dr. Wolfgang Maison

## Vorbemerkung

Die vorliegende Dissertation wurde an der Justus-Liebig-Universität Giessen in der Abteilung für Allgemeine Pädiatrie und Neonatologie (Leitung: Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer) in Kooperation mit dem Institut für organische Chemie (Leitung: Prof. Dr. Wolfgang Maison) und der Methodenplattform ‚Stabile Isotope und Zellbiologie‘ am Institut für Ernährungswissenschaften (Leitung: Prof. Dr. Silvia Rudloff) erstellt. Die Synthese der Gliadinpeptide sowie deren Fluoreszenzmarkierung (Abschnitt 4.2) wurden durch Dr. Sevgi Arampatzi aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Wolfgang Maison durchgeführt und sind daher auch Bestandteil der Dissertation von Dr. Sevgi Arampatzi. Teile der vorliegenden Arbeit wurden im Zuge der Kooperation bereits in der Dissertationsschrift von Dr. Sevgi Arampatzi dargestellt.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten massenspektrometrischen Messungen (Abschnitt 4.9) erfolgten durch Prof. Dr. Günter Lochnit (Arbeitsgruppe ‚Protein Analytik‘ am Biochemischem Institut des Fachbereichs Medizin, Justus-Liebig-Universität Giessen) im Rahmen einer wissenschaftlichen Kooperation.

Teile der Arbeit (Abschnitt 5.4 und 5.5) entstanden im Rahmen eines von der Deutschen Zöliakie Gesellschaft (DZG) geförderten Forschungsaufenthaltes am Department of Immunohematology and Blood Transfusion (Leitung: Prof. Dr. Frits Koning) der Leiden University (Leiden, Niederlande).

## Danksagung

Mein Dank gilt all denen, die mich in den Jahren meiner Dissertation unterstützt und die Fertigstellung dieser Arbeit ermöglicht haben.

Besonders möchte ich mich bei Prof. Dr. Silvia Rudloff für die umfassende Betreuung und Unterstützung bedanken, ohne welche es diese Arbeit nicht gegeben hätte. Durch viele anregende Diskussionen und motivierende Worte verlor ich auch in schwierigen Momenten mein Ziel nicht aus den Augen.

Ein großes Dankeschön geht auch an die Arbeitsgruppe der organischen Chemie von Prof. Dr. Wolfgang Maison für die äußerst konstruktive und nette Kooperation. Als mein zweiter Betreuer stand mir Prof. Dr. Wolfgang Maison immer mit Rat und Tat zu Seite. Aus dieser Arbeitsgruppe möchte ich mich auch besonders bei Dr. Sevgi Arampatzi bedanken. Sie synthetisierte die in meinen Versuchen eingesetzten Gliadinpeptide und unterstützte mich auch geduldig bei weiteren Fragestellungen und Auswertungen.

Für die MALDI-TOF-MS Messungen sowie für die ausführlichen Erklärungen möchte ich mich bei unserem Kooperationspartner Prof. Dr. Günter Lochnit aus der Arbeitsgruppe Protein Analytik am Biochemischen Institut des Fachbereichs Medizin bedanken.

Aus der Abteilung für pädiatrische Hämatologie und Onkologie möchte ich Dr. Vijay Singh danken. Durch seine hervorragende Einarbeitung und Unterstützung erlernte ich die Isolation und Generierung dendritischer Zellen, was mich bei meiner Arbeit ein großes Stück voran brachte.

Ein weiteres Dankeschön sende ich an die gesamte Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frits Koning am Department of Immunohematology and Blood Transfusion an der University Leiden (Niederlande). Während meines dortigen Forschungsaufenthalts erlernte ich Methoden zur Isolation und Kultivierung von T-Zellen, die Durchführung von Proliferationsassays sowie den Umgang mit dem Durchflusszytometer.

Mein besonderer Dank gilt auch der gesamten Arbeitsgruppe der Allgemeinen Pädiatrie und Neonatologie von Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer. Insbesondere danke ich Prof. Dr. Klaus-Peter Zimmer für viele interessante Anregungen und Diskussionen, die mir auch Einblicke in weitere wissenschaftliche Fragestellungen ermöglichten.

Für die exzellente Unterstützung und methodische Einarbeitung bedanke ich mich herzlichst bei Bettina Goritzka, Nadine Metz, Larissa Thiessen, Bianca Walber und Marcel Zoremba. Ihnen und meinen weiteren Kolleginnen Kristine Weber, Tanja Weidenhausen und Dr. Claudia Wendt danke ich außerdem für die angenehme Arbeitsatmosphäre sowie so manche erheiternde Pause, wodurch sich auch meine hin und wieder festgefahrenen Gedanken neu sortieren konnten.

Des Weiteren gilt mein Dank der gesamten Arbeitsgruppe des Instituts für Ernährungswissenschaften von Prof. Dr. Clemens Kunz, wo ich durch Anfertigung meiner Bachelor- und Masterthesis die Grundlage für meinen wissenschaftlichen Werdegang legen durfte. Neben der exzellenten methodischen Unterstützung durch Cordula Becker, Dr. Christian Borsch, Dr. Sabine Kuntz und Nicole Tscherney hatte ich auch mit allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe viele schöne und inspirative Momente während meiner Zeit als Doktorand.

Auch möchte ich der Deutschen Zöliakie Gesellschaft (DZG) für den Forschungspreis 2011 meinen Dank aussprechen, wodurch ein Teil unseres Forschungsprojekts finanziert werden konnte.

Zu guter Letzt möchte ich mich auch bei meiner Freundin Sabrina, meiner Familie und meinen Freunden bedanken. Ihr habt mir die Unterstützung und Kraft gegeben dieses Werk zu vollenden.

# I. Inhaltsverzeichnis

II. Abbildungsverzeichnis.....	III
III. Tabellenverzeichnis.....	VI
IV. Abkürzungsverzeichnis .....	VI
V. Aminosäurecodes .....	X
1 Einleitung .....	1
1.1 Zöliakie.....	1
1.1.1 Klinische Symptomatik.....	1
1.1.2 Epidemiologie .....	3
1.1.3 Genetische Prädisposition .....	5
1.1.3.1 Einfluss des HLA-Typs .....	6
1.1.3.2 Weitere genetische Einflussfaktoren .....	9
1.2 Gluten .....	10
1.3 Intestinale Permeabilität von Nahrungsantigenen .....	14
1.4 Das Immunsystem .....	19
1.4.1 Das unspezifische Immunsystem .....	19
1.4.2 Das spezifische Immunsystem .....	21
1.4.3 Das darmassoziierte Immunsystem.....	22
1.5 Interaktion von Gliadinpeptiden mit dem darmassoziierten Immunsystem.....	24
1.5.1 Interaktion mit dem angeborenen Immunsystem .....	25
1.5.2 Reifung dendritischer Zellen unter dem Einfluss von Gliadin.....	27
1.5.3 Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem.....	30
1.6 Enterozyten als antigenpräsentierende Zellen .....	31
1.7 Orale Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen .....	33
2 Zielsetzung.....	35
3 Material .....	37
3.1 Antikörper.....	37
3.2 Chemikalien und Reagenzien .....	38
3.3 Hergestellte Lösungen .....	40
3.4 Zelllinien .....	41
3.5 Medien.....	41
3.6 Verbrauchsmaterialien .....	41
3.7 Geräte .....	43

---

3.8	Bioinformatische Programme .....	46
4	Methoden .....	47
4.1	Zellkultur .....	47
4.1.1	Beschreibung der verwendeten intestinalen Zelllinien .....	47
4.1.1.1	HT-29-Zellen .....	47
4.1.1.2	Caco-2-Zellen .....	47
4.1.2	Kultivierung der Zelllinien .....	47
4.1.2.1	Wechsel des Kulturmediums .....	48
4.1.2.2	Passagieren der Zellen .....	48
4.1.2.3	Einfrieren von Zellen .....	48
4.1.2.4	Auftauen von Zellen .....	49
4.1.2.5	Ermittlung der Zellzahl .....	49
4.2	Synthese von Peptiden .....	50
4.2.1	Darstellung von P31-43 und P56-68 .....	51
4.2.2	Kopplung von P31-43 und P56-68 mit Fluoreszenzfarbstoff .....	54
4.3	Zelluläre Aufnahme von Gliadinpeptiden .....	58
4.4	Messung des enterozytären Gliadinpeptidtransports .....	59
4.5	Isolierung von peripheren mononukleären Zellen .....	61
4.5.1	Kultivierung von T-Zell-Klonen .....	61
4.5.2	Isolation von Monozyten .....	62
4.5.3	Generierung unreifer dendritische Zellen .....	64
4.6	Inkubation unreifer dendritischer Zellen mit Gliadinpeptiden .....	64
4.7	Stimulation der Expression von HLA-Molekülen auf Caco-2- und HT-29-Zellen .....	65
4.8	Fluoreszenzspektroskopie .....	65
4.9	MALDI-TOF-Massenspektrometrie .....	66
4.10	Durchflusszytometrie .....	67
4.11	Konfokale Laser Scanning Mikroskopie .....	69
4.12	ELISA .....	69
4.13	[ <sup>3</sup> H]-Thymidin-Proliferationsassay .....	71
5	Ergebnisse .....	73
5.1	Aufnahme und Transport fluoreszenzmarkierter Gliadinpeptide .....	73
5.2	Transport fluoreszenzmarkierter Gliadinpeptide über Caco-2-Monolayer .....	76
5.2.1	Translokation fluoreszenzmarkierter Gliadinpeptide .....	76

5.2.2	Zelluläre Aufnahme von Gliadinpeptiden .....	77
5.2.3	Abbau von P31-43 und P56-68 durch Caco-2-Zellen .....	81
5.3	Einfluss von Gluten und Gliadinpeptiden auf die Reifung von dendritischen Zellen .....	84
5.4	Analyse der Expression von HLA-Molekülen auf Caco-2- und HT-29- Zellen .....	91
5.5	T-Zell-Proliferationsassay .....	94
6	Diskussion .....	95
6.1	Intestinale Aufnahme von Gliadinpeptiden .....	95
6.1.1	Aufnahme und Transport von Gliadinpeptiden in Enterozyten .....	95
6.1.2	Translokation und Abbau von Gliadinpeptiden durch Enterozyten .....	97
6.2	Reifung dendritischer Zellen .....	102
6.2.1	Beeinflussung der Reifung dendritischer Zellen durch Gliadin .....	102
6.2.2	Beeinflussung der Reifung dendritischer Zellen durch immunogene und toxische Gliadinpeptide .....	104
6.2.3	Beeinflussung der Reifung dendritischer Zellen durch Caco-2- Zellkulturmedium .....	107
6.3	Interaktion von Enterozyten mit T-Zellen .....	110
7	Zusammenfassung .....	114
8	Summary .....	116
9	Perspektiven .....	118
10	Literaturverzeichnis .....	120
	Erklärung .....	136

## II. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1:	Histologischer Vergleich der Dünndarmmukosa von Gesunden und Zöliakie-Patienten. ....	1
Abb. 1-2:	Klinische Symptomatik bei Zöliakie. ....	3
Abb. 1-3:	Prävalenz der Zöliakie. ....	4
Abb. 1-4:	Weltweite Prävalenz von Zöliakie, Weizenkonsum und Häufigkeit des HLA-DR3-DQ2- und -DR4-DQ8-Haplotyps. ....	5
Abb. 1-5:	Verbindung von MHC-Klasse-II-Molekülen mit Zöliakie. ....	8
Abb. 1-6:	Anteil der HLA-DQ2-positiven Individuen mit Zöliakie. ....	9



Abb. 1-7:	Neueinteilung von Individuen für ein mittleres bis hohes Zöliakie-Risiko. ....	10
Abb. 1-8:	Klassifikation von Gluten aus Weizen. ....	11
Abb. 1-9:	Typen der Endozytose. ....	15
Abb. 1-10:	Basiselemente der Endozytose. ....	16
Abb. 1-11:	Endozytotische Transportprozesse in polarisierten Epithelzellen. ....	18
Abb. 1-12:	Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe. ....	24
Abb. 1-13:	Modell des epithelialen Transports und der Immunerkennung von Gluten bei Zöliakie. ....	27
Abb. 1-14:	Reifung intestinaler dendritischer Zellen. ....	28
Abb. 1-15:	Kontakt intestinaler Epithelzellen mit T-Zellen in der intestinalen Mukosa. ....	31
Abb. 1-16:	Hypothetisches Modell der Interaktion von intestinalen Epithelzellen und T-Zellen in der intestinalen Mukosa. ....	33
Abb. 4-1:	Auszählen der Zellen mithilfe eines Hämozytometers. ....	50
Abb. 4-2:	LC-MS-Spektren von P31-43 (LGQQQPFPPQQPY). ....	53
Abb. 4-3:	LC-MS-Spektren von P56-68 (LQLQFPQPQLPY). ....	54
Abb. 4-4:	LC-MS-Spektren von PromoFluor-488-markiertem P31-43 (PF-488-LGQQQPFPPQQPY). ....	55
Abb. 4-5:	LC-MS-Spektren von PromoFluor-488-markiertem P56-68 (PF-488-LQLQFPQPQLPY). ....	56
Abb. 4-6:	LCMS-Spektren von Lissamin Rhodamin B-markiertem P31-43 (Liss-LGQQQPFPPQQPY). ....	57
Abb. 4-7:	LCMS-Spektren von Lissamin Rhodamin B-markiertem P56-68 (Liss-LQLQFPQPQLPY). ....	58
Abb. 4-8:	Methodischer Ablauf der Versuche zum enterozytären Gliadintransport. ....	59
Abb. 4-9:	Phasentrennung durch Dichtezentrifugation. ....	61
Abb. 4-10:	Funktionsprinzip von MACS. ....	63
Abb. 4-11:	Schema des MALDI-TOF-MS-Verfahrens. ....	67
Abb. 4-12:	Funktionsprinzip des Quantikine ELISA. ....	70
Abb. 5-1:	Transport von P31-43 in Caco-2-Zellen. ....	74
Abb. 5-2:	Transport von P56-68 in Caco-2-Zellen. ....	75

---

Abb. 5-3:	Fluorometrische Analyse der Translokation von Gliadinpeptiden über ein epitheliales Monolayer.....	77
Abb. 5-4:	Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären Aufnahme von Gliadinpeptiden. ....	78
Abb. 5-5:	Vergleich der zellulären Aufnahme von Gliadinpeptiden. ....	79
Abb. 5-6:	CLSM-Analyse der zellulären Aufnahme von Gliadinpeptiden. ....	80
Abb. 5-7:	Abbau von P31-43 und P56-68 durch Caco-2-Zellen.....	83
Abb. 5-8:	Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern auf Monozyten.....	85
Abb. 5-9:	Durchflusszytometrische Analyse von Reifungsmarkern auf iDC.....	86
Abb. 5-10:	Durchflusszytometrische Analyse von iDC nach 24 h Inkubation mit P31-43, P56-68 und LPS in iDC-Inkubationsmedium. ....	87
Abb. 5-11:	Durchflusszytometrische Analyse von iDC nach 24 h Inkubation mit P31-43, P56-68 und LPS in HBSS.....	88
Abb. 5-12:	Durchflusszytometrische Analyse von iDC nach 24 h Inkubation mit dem basalen Inkubationsmedium aus Versuchen zum Transport fluoreszenzmarkierter Gliadinpeptide über Caco-2-Monolayer. ....	89
Abb. 5-13:	Beeinflussung der Zytokin-Sekretion (in pg/mL) von iDC nach 24 h in iDC-Inkubationsmedium. ....	90
Abb. 5-14:	Beeinflussung der Zytokin-Sekretion (in pg/mL) von iDC nach 24 h in HBSS.....	90
Abb. 5-15:	Beeinflussung der Zytokin-Sekretion (in pg/mL) von iDC nach 24 h in basalem Zellkulturmedium.....	91
Abb. 5-16:	Oberflächenexpression von HLA-Molekülen auf HT-29-Zellen. ....	92
Abb. 5-17:	Oberflächenexpression von HLA-Molekülen auf Caco-2-Zellen.....	93
Abb. 5-18:	Beeinflussung der Oberflächenexpression von HLA-Molekülen durch Inkubation mit Gliadinpeptiden. ....	93
Abb. 5-19:	T-Zell-Proliferationsassay.....	94
Abb. 6-1:	Funktion von CD209 bei der Interaktion von DC mit naiven T-Zellen.....	107
Abb. 6-2:	Hypothetisches Modell zum Transport von immunogenen und toxischen Gliadinpeptiden über die epitheliale Barriere und deren Wirkung auf das Immunsystem, abgeleitet von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. ....	113

### III. Tabellenverzeichnis

Tab. 1-1:	Zöliakie als systemische Erkrankung. ....	2
Tab. 1-2:	Formen der Zöliakie. ....	2
Tab. 1-3:	Zöliakie-assoziierte Erkrankungen. ....	6
Tab. 1-4:	HLA-DQ-Status und das Risiko für Zöliakie. ....	6
Tab. 1-5:	Toxische Gliadinpeptide. ....	12
Tab. 1-6:	Immunogene Gliadin- / Gluteninpeptide. ....	13
Tab. 4-1:	Versuchsansätze zur Messung des enterozytären Gliadinpeptidtransports. ....	60
Tab. 5-1:	Translokation von Gliadinpeptiden. ....	84

### IV. Abkürzungsverzeichnis

4-PL	<i>four parameter logistic</i>
Ahx	Aminohexansäure
ANOVA	<i>analysis of variance</i> (Varianzanalyse)
APN	Aminopeptidase N
APZ	antigenpräsentierende Zellen
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AUC	<i>area under the curve</i> (Flächen unter der Kurve)
Boc	<i>tert</i> -Butyloxycarbonyl
BSA	bovines Serumalbumin
CCR9	C-C-Chemokinrezeptor 9
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i> (konfokale Laser-Scanning Mikroskopie)
CPP	Carboxypeptidase P
CTB	Choleratoxin B
DC	<i>dendritic cell</i> (dendritische Zelle)
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin</i>
DHB	2,5-Dihydroxybenzoesäure
DIPEA	Diisopropylethylamin
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> (Desoxyribonukleinsäure)

---

DPP IV	Dipeptidylpeptidase IV
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i> (Epidermaler Wachstumsfaktor)
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESI-MS	Elektrosprayionisations-Massenspektrometrie
ESPGHAN	<i>European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i> (Fibroblasten-Wachstumsfaktor)
FKS	fetales Kälberserum
Fmoc	Fluorenyl-9-methyloxycarbonyl
GALT	<i>gut-associated lymphoid tissue</i> (darmassoziiertes lymphatisches Gewebe)
GF	<i>growth factors</i> (Wachstumsfaktoren)
GM1	Monosialotetrahexosylgangliosid
GM-CSF	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
gp180	Glycoprotein 180
GTP	Guanosintriphosphat
GWAS	<i>genome-wide association study</i> (genomweite Assoziationsstudien)
HBSS	<i>Hank's balanced salt solution</i>
HBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGNC	<i>HUGO Gene Nomenclature Committee</i>
HLA	<i>human leukocyte antigen</i> (humanes Leukozytenantigen)
HMW	<i>high-molecular-weight</i> (mit hohem Molekulargewicht)
HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
HPLC	<i>high-performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HS	humanes Serum
HSP	<i>heat shock protein</i> (Hitzeschockprotein)
HSP 3-14	<i>heat shock protein peptide 3-14</i>
HUGO	<i>Human Genome Organisation</i>

---

ICAM	<i>intercellular adhesion molecule</i> (interzelluläres Adhäsionsmolekül)
iDC	<i>immature dendritic cell</i> (unreife dendritische Zelle)
IEL	intraepitheliale Lymphozyten
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGF	<i>insulin-like growth factor</i> (Insulinähnlicher Wachstumsfaktor)
IMDM	<i>Iscoe's modified Dulbecco's medium</i>
JAK-STAT	<i>Janus kinase / signal transducer and activator of transcription</i>
LC-MS	<i>liquid chromatography–mass spectrometry</i> (Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie)
Liss	Lissamin Rhodamin B
LMW	<i>low-molecular-weight</i> (mit niedrigem Molekulargewicht)
LPL	<i>Lamina propria</i> Lymphozyten
LPS	Lipopolysaccharid
LTB	<i>heat-labile enterotoxin B subunit</i> (hitzelabile Enterotoxin-B-Untereinheit)
MACS	<i>magnetic-activated cell sorting</i>
MAdCAM-1	<i>mucosal addressin cell-adhesion molecule 1</i> (mukosales Adressin-Zelladhäsionsmolekül-1)
MALDI-TOF-MS	<i>matrix-assisted laser desorption / ionization – time of flight mass spectrometry</i> (matrixunterstützte Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion)
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i> (Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kaskade)
MFI	<i>mean fluorescence intensity</i> (mittlere Fluoreszenzintensität)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> (Haupt-Histokompatibilitätskomplexes)
MICA	<i>MHC class I chain-related molecule A</i> (MHC-Klasse-I-verwandtes Molekül A)
MICB	<i>MHC class I chain-related molecule B</i> (MHC-Klasse-I-verwandtes Molekül A)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
M-Zellen	<i>Microfold-Zellen</i>
M $\beta$ CD	Methyl- $\beta$ -cyclodextrin
<i>N,N</i> -DMF	Dimethylformamid
NEAA	<i>non-essential amino acids</i> (nicht-essentielle Aminosäuren)
NEt <sub>3</sub>	Triethylamin
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>

---

NK-Zellen	natürliche Killerzellen
OD	optischen Dichte
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i> (periphere mononukleäre Zellen)
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blute)
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
PF	PromoFluor-488
PFA	Paraformaldehyd
PHA	<i>purified phytohemagglutinin</i> (gereinigtes Phytohämagglutinin)
PRR	<i>pattern recognition receptor</i> (Mustererkennungsrezeptor)
RP	<i>reversed phase</i> (Umkehrphasen)
RPMI 1640	Roswell Park Memorial Institute 1640
SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese)
slgA	sekretorisches Immunglobulin A
SPPS	<i>solid phase peptide synthesis</i> (Festphasen-Peptidsynthese)
TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i> (Antigenpeptid-Transporter)
<sup>t</sup> Bu	tert-Butyl
TEER	<i>transepithelial electrical resistance</i> (transepithelialer elektrischer Widerstand)
TFA	Trifluoressigsäure
TGF	<i>transforming growth factor</i> (Transformierender Wachstumsfaktor)
T <sub>H</sub> 17-Zellen	Typ17-T-Helferzellen
TH1-Zellen	Typ1-T-Helferzellen
T <sub>H</sub> 2-Zellen	Typ2-T-Helferzellen
TIS	Triisopropylsilan
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
T <sub>Reg</sub>	regulatorische T-Zellen
TrypLE	<i>trypsin-like enzyme</i>
TSLP	<i>thymic stromal lymphopoietin</i>
tTG	<i>tissue transglutaminase</i> (Gewebsstransglutaminase)
UV	Ultraviolettstrahlung
VPS	<i>vacuolar protein sorting</i>

---

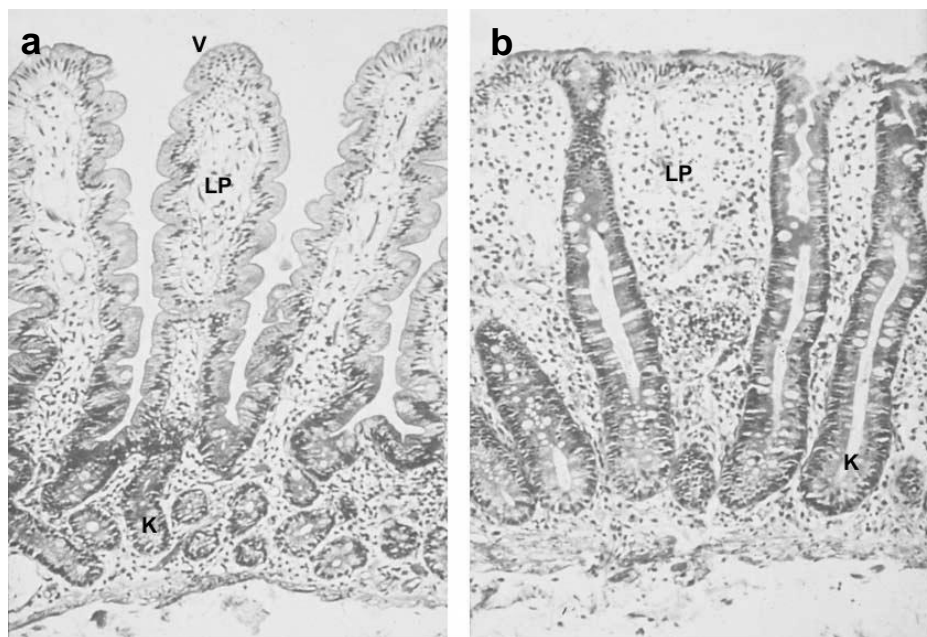
## V. Aminosäurecodes

A	Ala	Alanin	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	N	Asn	Asparagin
D	Asp	Asparaginsäure	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	Q	Gln	Glutamin
F	Phe	Phenylalanin	R	Arg	Arginin
G	Gly	Glycin	S	Ser	Serin
H	His	Histidin	T	Thr	Threonin
I	Ile	Isoleucin	V	Val	Valin
K	Lys	Lysin	W	Trp	Tryptophan
L	Leu	Leucin	Y	Tyr	Tyrosin

# 1 Einleitung

## 1.1 Zöliakie

Nach den Kriterien der *European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* (ESPGHAN) von 2012 wird die Zöliakie als eine immunvermittelte, systemische Erkrankung definiert, die durch Gluten und verwandte Prolamine in genetisch prädisponierten Individuen hervorgerufen wird. Charakteristisch für die Zöliakie ist das Vorhandensein unterschiedlicher Kombinationen von gluten-abhängigen klinischen Manifestationen, Zöliakie-spezifischen Antikörpern, den humanen Leukozytenantigen (*human leukocyte antigen*, HLA) -DQ2- und HLA-DQ8-Haplotypen sowie histologische Veränderungen der intestinalen Mukosa (Abb. 1-1). Die bisher einzige Therapie stellt eine lebenslange glutenfreie Ernährung dar [1,2].



**Abb. 1-1: Histologischer Vergleich der Dünndarmmukosa von Gesunden und Zöliakie-Patienten.** (a) Gesunde Mukosa mit Villi (V) und Krypten (K). Die *Lamina propria* (LP) dehnt sich zwischen den Krypten und innerhalb der Villi aus. (b) Mukosa bei Zöliakie, charakterisiert durch Villusatrophie, hyperplastische Krypten und erhöhte Infiltration von *Lamina propria* und Epithelium durch lymphoidale Zellen. Adaptiert nach [3].

### 1.1.1 Klinische Symptomatik

Das klinische Spektrum der Zöliakie ist sehr heterogen. Von der Erkrankung ist nicht allein der Intestinaltrakt betroffen. Vielmehr handelt es sich um eine systemische Erkrankung, bei der unter anderem auch Haut, Knochen, Herz, Leber,



Reproduktionsorgane und Nervensystem in Mitleidenschaft gezogen werden können (Tab. 1-1). Beeinflusst wird die klinische Manifestation unter anderem durch das Erkrankungsalter, das Ausmaß der Mukosaschädigung, die Ernährungsgewohnheiten und das Geschlecht des Patienten.

**Tab. 1-1: Zöliakie als systemische Erkrankung.** Organe, die bei einer Zöliakie betroffen sein können. Adaptiert nach [4,5].

Organe	Dysfunktionen / Symptome
Gastrointestinaltrakt	Durchfall, Erbrechen, Blähungen, Unterleibsschmerzen, Malnutrition, Gewichtsverlust, Hepatitis, Cholangitis, T-Zell-Lymphome
Zähne, Knochen und blutbildende Organe	Osteoporose, Frakturen, Arthritis, dentale Anomalien, Anämie
Zentrales Nervensystem	Ataxie, Krämpfe, Depression
Herz	Karditis
Haut	Dermatitis herpetiformis, Aphten, Haarverlust
Endokrine Organe	Fehlgeburt, Infertilität, Pubertäts- und Wachstumsverzögerungen

Die Zöliakie kann in unterschiedlichen Formen (Tab. 1-2) auftreten, die in einigen Stadien nicht in Verbindung mit morphologischen Anzeichen oder klinischen Symptomen stehen (Abb. 1-2).

**Tab. 1-2: Formen der Zöliakie.** Adaptiert nach [6].

	DQ2/8	Antikörper	Histologie	Symptome
<b>Aktive Zöliakie</b>	+	+	+	+
<b>Silente Zöliakie</b>	+	+	+	-
<b>Latente Zöliakie</b>	+	-/+	- (+)*	-/+
<b>Potentielle Zöliakie</b>	+	+	-	-/+

\* Im vergangenen Krankheitsverlauf +

Die aktive, auch als klassische Zöliakie bezeichnete Form der Zöliakie ist durch intestinale und teilweise extraintestinale Symptome charakterisiert. Neben erhöhtem Vorkommen von Endomysium- und Transglutaminase-Antikörpern lässt sich auch morphologisch eine Villusatrophie und Kryptenhyperplasie erkennen. Im Gegensatz zu den nicht-klassischen Formen wird die klassische Zöliakie meist bereits zwischen dem 6. und 18. Lebensmonat diagnostiziert. Die latente Zöliakie geht einer diagnostizierten Zöliakie voraus bzw. besteht bei einer erfolgreichen Behandlung der Erkrankung mittels glutenfreier Diät und kann mit oder ohne Symptome auftreten. Hierbei ist weder eine Atrophie der Villi noch eine Hyperplasie der Krypten

erkennbar. Das Vorkommen  $\gamma/\delta$ -positiver intraepithelialer Lymphozyten (IEL), die Teilungsrate von Krypten sowie leichte morphologische Veränderungen von Enterozyten sind allerdings erhöht. Auch können bei vielen Patienten mit latenter Zöliakie Autoantikörper gegen Transglutaminase und Endomysium nachgewiesen werden. Bei oraler Aufnahme von Gluten kann diese Form der Erkrankung in eine aktive Zöliakie übergehen. Die silente Zöliakie verläuft trotz vorliegender histologisch sichtbarer Läsionen asymptomatisch. Autoantikörper gegen Transglutaminase und Endomysium sind bei dieser Form der Zöliakie erhöht. Für die Diagnose einer potentiellen Zöliakie erfolgt eine Detektion von Transglutaminase- und Endomysium-Antikörpern. Es liegt allerdings keine Enteropathie vor. Diese Form der Zöliakie kann Symptome aufweisen, aber auch asymptomatisch verlaufen; zu einem späteren Lebenszeitpunkt kann sie in eine aktive Zöliakie übergehen. [6,4,7,1]

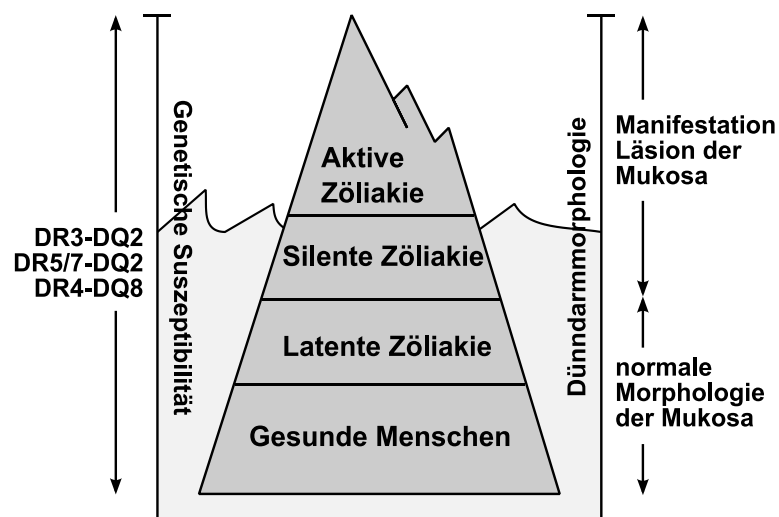
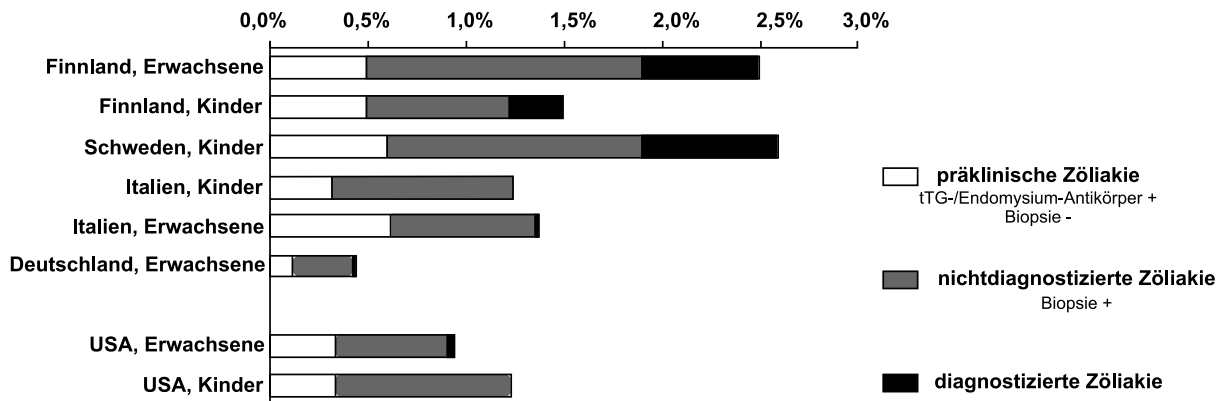


Abb. 1-2: Klinische Symptomatik bei Zöliakie. Adaptiert nach [8].

### 1.1.2 Epidemiologie

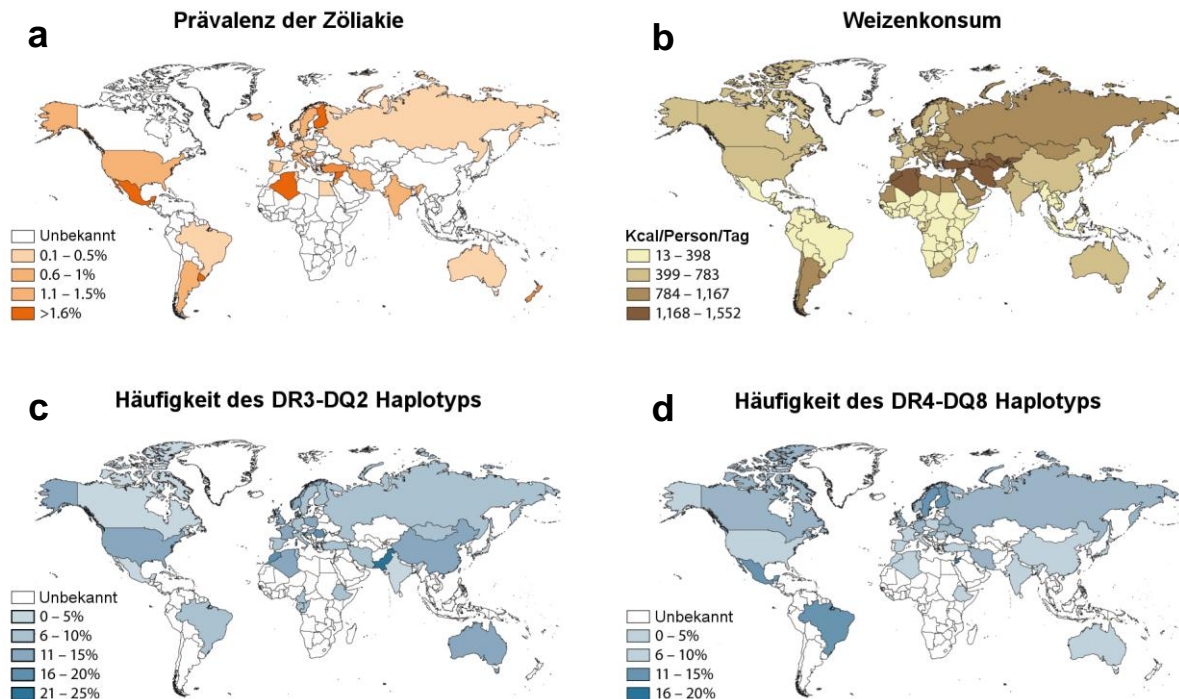
Ein hoher Erkenntniszuwachs und verbesserte diagnostische Methoden führten in den letzten Jahren zu einem starken Anstieg der Zöliakie-Inzidenz. Es wird allerdings auch angenommen, dass die gestiegene Inzidenz nicht allein auf die methodische Entwicklung zurückzuführen ist, sondern auch einen tatsächlichen Anstieg der Prävalenz reflektiert. Der Anteil der Erkrankten wird in westlichen Populationen auf etwa 1 % geschätzt. Die angegebene Prävalenz ist dabei abhängig von der zugrunde liegenden Definition der Zöliakie. Die Kombination von nicht diagnostizierter (hauptsächlich silente Form) und diagnostizierter (meist aktive Form) Zöliakie ergibt

in einem Großteil der Populationen eine Prävalenz zwischen 0,5 und 2 %. Hierbei wird eine hohe Dunkelziffer vermutet. Des Weiteren treten abhängig von der geographischen Verteilung Unterschiede auf (Abb. 1-3). Somit ist die Zöliakie eine der am häufigsten auftretenden entzündlichen Erkrankungen [4,7,9].



**Abb. 1-3: Prävalenz der Zöliakie.** Unterscheidung zwischen präklinischer, nicht-diagnostizierter und diagnostizierter Zöliakie. Adaptiert nach [4].

Da Weizen eine der Hauptquellen für die Aufnahme von Gluten darstellt, erfolgt eine Beurteilung des globalen Konsums an Gluten anhand des Verzehrs von Weizen. Abb. 1-4 zeigt eine Zusammenstellung der weltweiten Prävalenz, des Weizenkonsums und der Verteilung des HLA-DQ2 / -DQ8 Genotyps. Obwohl diese Faktoren für die Entstehung einer Zöliakie notwendig sind, besteht laut Abadie et al. [9] keine signifikante Korrelation zwischen Zöliakie-Prävalenz und Weizenkonsum bzw. HLA-DQ2 / -DQ8 Genotyp. Entsprechend den Berechnungen von Abadie et al. ist der fehlende statistische Zusammenhang allerdings von wenigen Populationen begründet, die als deutliche Ausreißer zu deklarieren sind (Algerien, Finnland, Mexiko, Nord-Indien und Tunesien). Die Existenz von Ausreißern sowie das Fehlen einer vollständigen Korrelation weisen darauf hin, dass weitere Umwelteinflüsse und genetische Faktoren zur Entstehung der Pathogenese beitragen [10].



**Abb. 1-4: Weltweite Prävalenz von Zöliakie, Weizenkonsum und Häufigkeit des HLA-DR3-DQ2- und -DR4-DQ8-Haplotyps.** (a) Prävalenz der Zöliakie basierend auf Screening-Daten einer erwachsenen Population bzw. von Kindern, falls die Prävalenz von Erwachsenen nicht bekannt war. (b) Weltweite Verteilung des Weizenkonsums. (c) Häufigkeit des DR3-DQ2-Haplotyps. (d) Häufigkeit des DR4-DQ8-Haplotyps. Adaptiert nach [10]

### 1.1.3 Genetische Prädisposition

Eine erhöhte Zöliakie-Prävalenz innerhalb der Verwandtschaft ersten Grades (10 %) sowie eine hohe Konkordanz bei monozygoten Zwillingen (75 %) lässt auf genetisch prädisponierende Faktoren schließen. Darüber hinaus wird die Erkrankung zweimal häufiger bei Frauen als bei Männern diagnostiziert. Auch besteht eine Assoziation mit weiteren Erkrankungen, die in Tab. 1-3 aufgeführt sind.

Neben den Umweltfaktoren ist Zöliakie eine Erkrankung mit polygenetischer Ursache. Ein starker Zusammenhang scheint hierbei mit den Genen des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes (*major histocompatibility complex*, MHC) zu bestehen. Beim Menschen sind diese auf dem kurzen Arm von Chromosom 6 (6p21) lokalisiert und werden als HLA bezeichnet [11–13,7,10].

**Tab. 1-3: Zöliakie-assoziierte Erkrankungen.** Adaptiert nach [6].

Diabetes mellitus Typ 1
Autoimmunthyreoiditis
Autoimmune Lebererkrankung
Sjögren-Syndrom
Alopecia areata
Immunglobulin-A-Mangel
Down Syndrom
Turner Syndrom
Williams Syndrom

### 1.1.3.1 Einfluss des HLA-Typs

Bei fast allen Zöliakie-Patienten ist eine genetische Assoziation mit HLA-DQ2 und / oder -DQ8 ersichtlich, wobei ein stärkerer Zusammenhang der Erkrankung mit HLA-DQ2 gesehen wird. Das alleinige Auftreten von HLA-DQ2 und -DQ8 ist allerdings keine ausreichende Indikation für eine Zöliakie, da dieser HLA-Typ auch bei gesunden Individuen auftritt. Eine Übersicht der HLA-Typen, die mit Zöliakie assoziiert sind, sowie das entsprechende Risiko für eine Erkrankung sind in Tab. 1-4 aufgeführt.

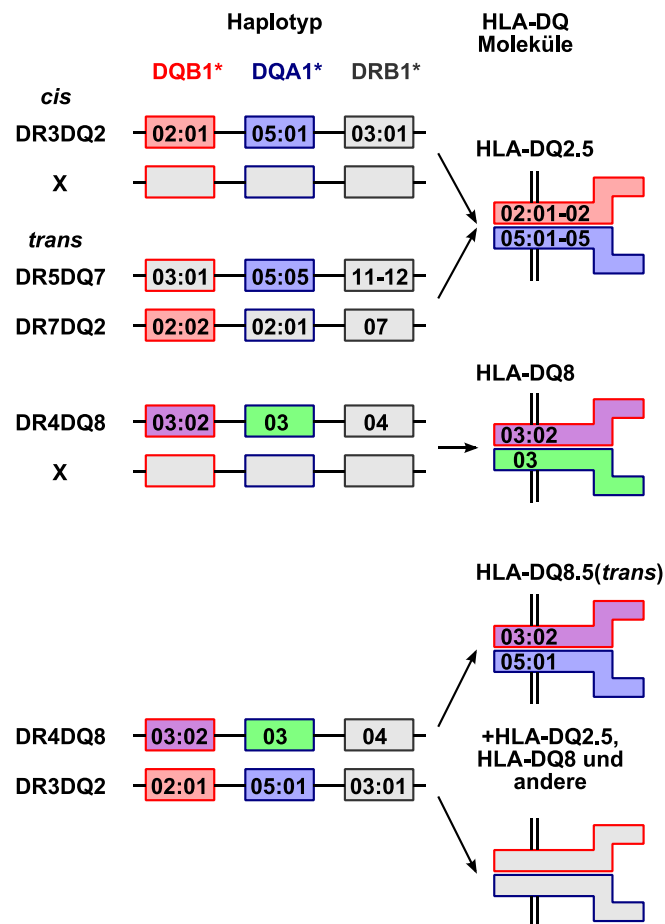
**Tab. 1-4: HLA-DQ-Status und das Risiko für Zöliakie.** Adaptiert nach [14,15].

Kurzform	HLA-DQA1*	HLA-DQB1*	Risiko
DQ2.5 <sup>#</sup> und DQ8	05:01/05 und 03:01	02:01/02 und 03:02	sehr hoch
DQ2.5 <sup>#</sup>	05:01/05	02:01/02 (homozygot)	sehr hoch
DQ2.5 <sup>#</sup>	05:01/05	02:01/02 (heterozygot)	hoch
DQ8	03:01	03:02	hoch
DQ2.x	x (≠05:01/05)	02:01/02 (homozygot)	hoch
DQ2.x	x (≠05:01/05)	02:01/02 (heterozygot)	niedrig
DQX.5	05:01/05	X (≠02:01/02 oder 03:02)	sehr niedrig
DQX.x	x (≠05:01/05)	X (≠02:01/02 oder 03:02)	sehr niedrig

<sup>#</sup> kann in *cis* oder *trans* vorliegen:

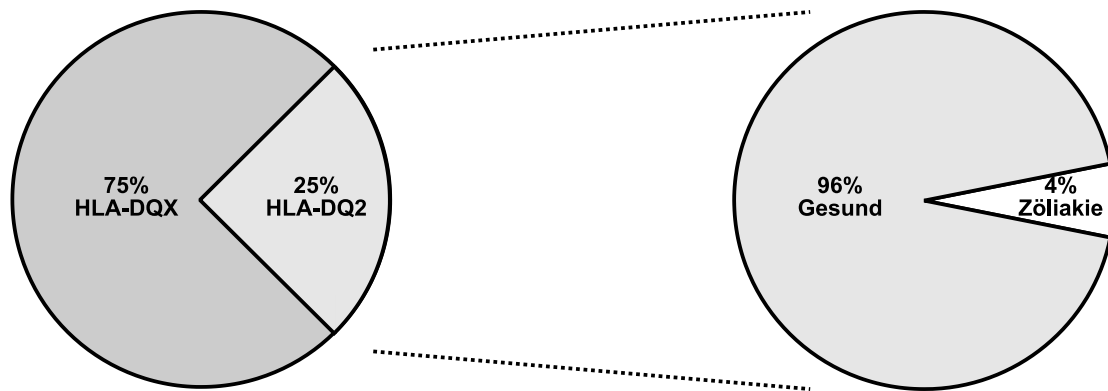
Kurzform	HLA-DQA1*	HLA-DQB1*
DQ2.5 <i>cis</i>	05:01	02:01
DQ2.5 <i>trans</i>	05:05	02:02

In den meisten Fällen ist eine primäre Assoziation mit HLA-DQ2.5 (kodiert durch DQA1\*0501 ( $\alpha$ -Kette) und DQB1\*0201 ( $\beta$ -Kette)) zu beobachten. Etwa 90 – 95 % der Zöliakie-Patienten sind Träger des DR3-DQ2-Haplotyps (DRB1\*0301-DQA1\*0501-DQB1\*0201) oder sind heterozygot für DR5-DQ7 und DR7-DQ2 (DRB1\*11/12-DQA1\*0505-DQB1\*0301 und DRB1\*07-DQA1\*0201-DQB1\*0202). Dabei unterscheiden sich die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Ketten (kodiert durch DQA1\*0501 bzw. DQA1\*0505 ( $\alpha$ -Ketten) und DQB1\*0201 bzw. DQB1\*0202 ( $\beta$ -Ketten)) nur durch eine Aminosäure. Zöliakie-Patienten mit dieser DR-DQ-Haplotyp-Kombination exprimieren funktional das gleiche HLA-DQ-Molekül. Die HLA-Moleküle können hierbei entweder in der *cis*- (DQA1\*0501 und DQB1\*0201 bei Homozygoten) oder in der *trans*-Konfiguration (DQA1\*0505 und DQB1\*0202 bei Heterozygoten) kodiert sein. Im Gegensatz zu HLA-DQ2.5 sind weitere Varianten von HLA-DQ2 wie HLA-DQ2.2 (DQA1\*0201, DQB1\*0202) nur mit einem geringen Risiko für Zöliakie assoziiert, da sich die Bindungseigenschaften für Peptide bei den beiden HLA-DQ2-Typen unterscheiden. Bei der Mehrheit der HLA-DQ2-negativen Zöliakie-Patienten besteht ein Zusammenhang mit HLA-DQ8 (DQA1\*03-DQB1\*0302). Etwa 5 – 10 % der Patienten sind positiv für den DR4-DQ8-Haplotyp (DRB1\*04-DQA1\*03-DQB1\*0302). Auch Individuen, die heterozygot für HLA-DQ2.5 (DQA1\*0501-DQB1\*0201) oder -DQ8 (DQA1\*03-DQB1\*0302) sind, besitzen ein erhöhtes Risiko für eine Erkrankung. (Abb. 1-5). Einige wenige Zöliakie-Patienten, die sowohl negativ für HLA-DQ2 als auch -DQ8 sind, exprimieren die  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Kette von HLA-DQ2 (DQA1\*05 oder DQB1\*02) [12,13,3,14].



**Abb. 1-5: Verbindung von MHC-Klasse-II-Molekülen mit Zöliakie.** Die Mehrheit der Zöliakie-Patienten exprimiert das HLA-DQ2.5 Heterodimer, das durch HLA-DQA1\*05 ( $\alpha$ -Kette) und HLA-DQB1\*02 ( $\beta$ -Kette) kodiert wird. Diese beiden Allele sind entweder in *cis*- (DR3-DQ2.5-Haplotyp) oder in *trans*-Konfiguration (heterozygot für DR5-DQ7 und DR7-DQ2) kodiert. Träger von HLA-DQ8 (DR4-DQ8-Haplotyp) sowie Träger des Transdimers HLA-DQ8.5 (heterozygot für DR3-DQ2.5 und DR4-DQ8) sind mit einem geringeren Risiko für Zöliakie assoziiert. Adaptiert nach [14].

Durch die mit Zöliakie assoziierten HLA-Moleküle können Bestandteile des Glutens an T-Zellen präsentiert werden. Im Fokus steht hierbei der in Ethanol lösliche Teil des Glutens, das sogenannte Gliadin bzw. die aus diesem hervorgehenden Gliadinpeptide. Es konnte gezeigt werden, dass  $CD4^+$  T-Zelllinien, die aus duodenalen Biopsien von Zöliakie-Patienten isoliert wurden, spezifisch auf Gliadinpeptide reagieren, die durch HLA-DQ2 bzw. -DQ8 präsentiert werden [15,16]. Dabei scheint der Haplotyp HLA-DQ8 im Vergleich zu HLA-DQ2 mit einem geringeren Risiko für die Entwicklung einer Zöliakie assoziiert zu sein [17,18]. Der HLA-Genotyp ist jedoch nicht alleine ausschlaggebend für die Erkrankung, da dieser in 25 % der europäischen Bevölkerung vertreten ist. Von diesen Individuen erkranken allerdings nur etwa 4 % an Zöliakie (Abb. 1-6) [2,10].

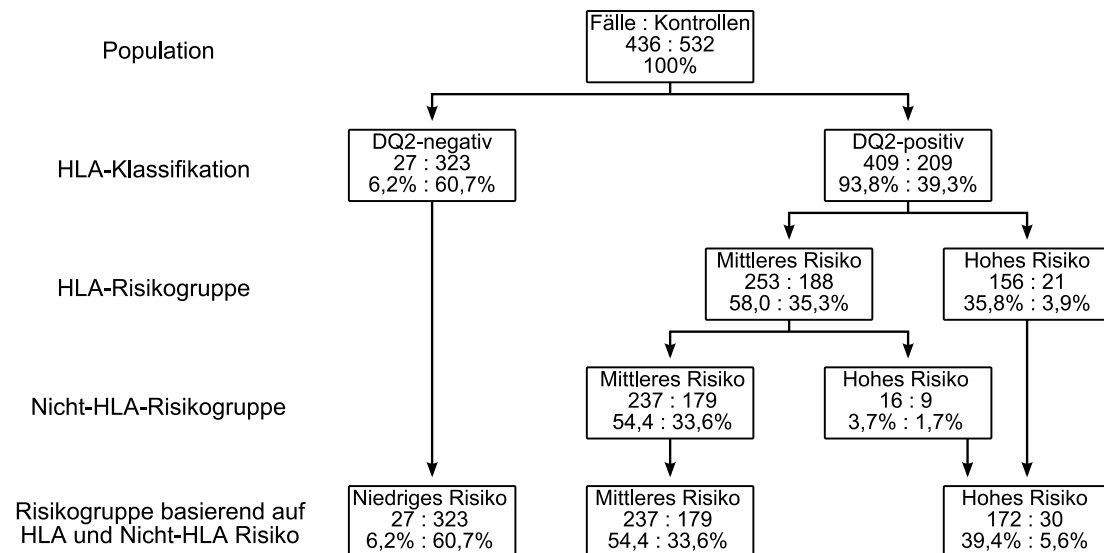


**Abb. 1-6: Anteil der HLA-DQ2-positiven Individuen mit Zöliakie.** Adaptiert nach [2].

### 1.1.3.2 Weitere genetische Einflussfaktoren

Neben den HLA-Genotypen wurden in genomweiten Studien auch nicht-HLA-Genloci identifiziert, die ebenfalls als Risikofaktoren für die Entstehung von Zöliakie angesehen werden. Viele Regionen werden für ein erhöhtes Zöliakie-Risiko in Betracht gezogen. Durch das *Human Genome Organisation* (HUGO) *Gene Nomenclature Committee* (HGNC) (<http://www.genenames.org>) wurden neben den als CELIAC1 bezeichneten HLA-Genloci aber nur drei weitere chromosomale Regionen als genetisch prädisponierend aufgenommen. Diese umfassen die chromosomalen Regionen 5q31-q33 (CELIAC2), 2q33 (CELIAC3) und 19p13.1 (CELIAC4) [19]. Genomweite Assoziationsstudien (*genome-wide association study*, GWAS) identifizierten viele weitere nicht-HLA-Loci, die mit einem erhöhten Zöliakie-Risiko in Verbindung stehen. Unter anderem kodieren diese Gene für Zytokine, Chemokine und deren Rezeptoren, Zelladhäsionsmoleküle sowie T- und B-Zell-Aktivatoren. In Kombination mit HLA-DQ2 bzw. -DQ8 können nicht-HLA-assoziierte Faktoren das Risiko einer Erkrankung steigern (Abb. 1-7) [20–24,19]. Nur ein Drittel der Nicht-HLA-Gene, die mit Zöliakie in Verbindung gebracht werden, sind ausschließlich mit Zöliakie assoziiert. Zwei Drittel sind mit hämatologischen, metabolischen, neurologischen, onkologischen und im Speziellen mit immun-assoziierten Erkrankungen verbunden. Der stärkste Zusammenhang besteht hierbei zwischen Typ 1-Diabetes, rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn [6].



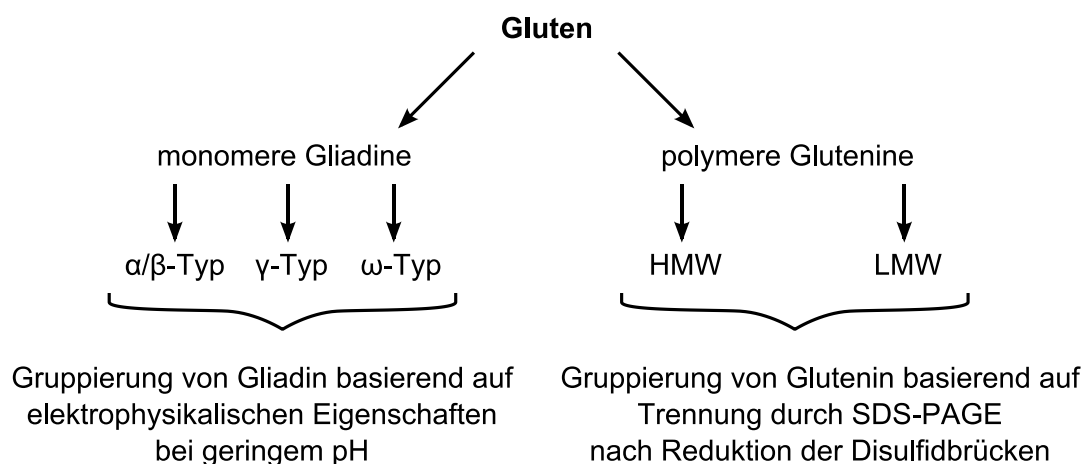


**Abb. 1-7: Neueinteilung von Individuen für ein mittleres bis hohes Zöliakie-Risiko.** Adaptiert nach [20].

## 1.2 Gluten

Neben der genetischen Prädisposition ist der Umweltfaktor Gluten entscheidend für den Ausbruch einer Zöliakie. Gluten gehört zu den Speicherproteinen in verschiedenen Getreidesorten. Hierzu zählen Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Dinkel, Kamut und Triticale [25]. Beispielsweise besteht das Weizenkorn aus den drei Hauptkomponenten Stärke, Proteinen und Polysacchariden der Zellwand. Dabei beträgt der Proteinanteil in der Trockenmasse je nach Sorte und Stickstoffangebot im Boden 10 – 15 %. Die Proteine lassen sich entsprechend der Extraktion nach Osborne [26] in vier Fraktionen aufteilen: Albumine (wasserlöslich), Globuline (löslich in Salzlösungen), Prolamine (löslich in Alkohol-Wasser-Gemischen) und Gluteline (löslich in verdünnten Säuren). Gluten setzt sich dabei etwa zu gleichen Teilen aus den beiden Osborne-Fractionen Prolamin und Glutelin zusammen und macht ca. 90 % der Proteinfraction aus. Bei Weizen werden die Prolamine als Gliadin und die Gluteline als Glutenine bezeichnet. In Bezug auf die Aminosäurezusammensetzung ist Gluten einzigartig, da es einen hohen Anteil an Glutamin und Prolin und nur einen geringen Anteil an Aminosäuren mit geladenen Seitengruppen enthält. Das Molekulargewicht der einzelnen Proteine reicht dabei von 30.000 bis 10 Mio. Dalton. Gliadine stellen hauptsächlich monomere Proteine dar, während Glutenine durch Disulfidbrücken und nicht-kovalente Bindungen verbundene Proteine enthalten. Gliadine lassen sich basierend auf ihren elektrophysikalischen Eigenschaften bei geringem pH-Wert in drei Gruppen einteilen. Diese setzen sich aus den

$\alpha/\beta$ -Gliadinen (hohe Mobilität), den  $\gamma$ -Gliadinen (mittlere Mobilität) und den  $\omega$ -Gliadinen (niedrige Mobilität) zusammen. Glutenine können nach Reduktion der Disulfidbindungen durch Separierung mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) als hochmolekular (*high molecular weight*, HMW) und niedermolekular (*low molecular weight*, LMW) klassifizieren werden (Abb. 1-8) [27,28].



**Abb. 1-8: Klassifikation von Gluten aus Weizen.** Adaptiert nach [27].

Entsprechend dem aktuellen Verständnis sind verschiedene Peptide des Glutens in unterschiedlicher Weise an der Pathogenese der Zöliakie beteiligt. Dabei wird zwischen sogenannten toxischen Gliadinpeptiden und immunogenen Gliadinpeptiden unterschieden. Toxische Gliadinpeptide induzieren in duodenalen Biopsien von Zöliakie-Patienten Mukosaschäden. Dagegen stimulieren immunogene Gliadinpeptide HLA-DQ2 oder -DQ8 spezifische T-Zell-Klone von Zöliakie-Patienten. Die als toxisch bzw. immunogen eingestuft Gliadinpeptide sind in Tab. 1-5 bzw. Tab. 1-6 aufgeführt. Die Zuordnung eines Peptids beschränkt sich allerdings nicht obligatorisch auf nur eine Gruppe, da für einige Peptide sowohl eine toxische als auch immunogene Wirkung beobachtet werden konnte. Unter den immunogenen Peptiden werden solche Epitope als immundominant bezeichnet, die eine starke T-Zell-Antwort vermitteln und dadurch bei fast allen Patienten eine spezifische T-Zell-Antwort auslösen. Dagegen führen die übrigen immunogenen Peptide nicht bei allen Patienten zu einer Immunreaktion. Zudem kann im Vergleich zu immunogenen Gliadinpeptiden nach oraler Aufnahme von immundominanten Epitopen auch eine frühere T-Zell-Antwort im peripheren Blut von Zöliakie-Patienten nachgewiesen

werden. Einige inaktive oder immunogene Peptide bewirkten erst nach einer Vorbehandlung mit Gewebstransglutaminase (*tissue transglutaminase*, tTG) eine potente T-Zell-Stimulation. Abhängig vom pH-Wert katalysiert tTG die irreversible Bindung von Glutamin-Residuen in Glutamin-Donor-Proteinen mit Lysin-Residuen in Glutamin-Akzeptor-Proteinen ( $\text{pH} > 7$ ), was als Transamidierung bezeichnet wird. Dagegen kann bei niedrigeren pH-Werten ( $\text{pH} < 7$ ), oder wenn kein Akzeptor-Protein vorhanden ist, Glutamin zu Glutaminsäure hydrolysiert werden. Diese Deamidierung kann bei Glutenpeptiden zu einer stärkeren Bindung an HLA-Moleküle und einer daraus resultierenden erhöhten Immunogenität führen [6,29,30].

Neben Gliadinpeptiden sind auch Gluteninpeptide bei der T-Zell-Stimulation involviert, wie beispielsweise ‚glt04 707-742‘ (GQQGYPTSPQQSGQ) und verschiedene Homologe dieses Peptids [31]. Für deamidierte HMW-Glutene wurde ebenfalls eine T-Zell-Antwort in Zöliakie-Patienten beschrieben, wobei auch teilweise Kreuzreaktivitäten mit Gliadinepitopen bestanden [32]. Darüber hinaus wird über die Immunogenität weiterer Prolamine und Gluteline aus Weizen, Gerste, Roggen und Hafer diskutiert [33–37,29].

**Tab. 1-5: Toxische Gliadinpeptide.** Adaptiert nach [29].

Aminosäuresequenz	Position	Toxizität
VPVPQLQPQNPSQQQPQEQ	$\alpha$ -Gliadin 3-21	-
PGQQQPFPPQQPY	$\alpha$ -Gliadin 31-43	+
PGQQQPFPPQQPYQPQPF	$\alpha$ -Gliadin 31-49	+
PGQQQPFPPQQPYQPQPFPSQQPY	$\alpha$ -Gliadin 31-55	+
PQPQPFPSQQPY	$\alpha$ -Gliadin 44-55	+
SQQPYLQLQPFPQPQLPY	$\alpha$ -Gliadin 51-70	+
LQLQPFQPQLPYQPQLPY	$\alpha$ -Gliadin 56-75	+
QQYPLGQGSFRPSQQNPQA	$\alpha$ -Gliadin 202-220	-
LGQGSFRPSQQN	$\alpha$ -Gliadin 206-217	+

**Tab. 1-6: Immunogene Gliadin- / Gluteninpeptide.** Adaptiert nach [29].

Aminosäuresequenz	Position	Immunogenität
VRVPVPLQLPQNPSQQQPQ	α-Gliadin 1-19	+
QNPSQQQPQEQVPLVQQQ	α-Gliadin 11-28	+
QVPLVQQQFPGQQQPFPPQ	α-Gliadin 21-40	+
PGQQQPFPPQQPYPQPQPF	α-Gliadin 31-49	+
FPGQQQPFPPQQPYPQPQPF	α-Gliadin 30-49	+
QPYPQPQPFPSQQPYLQL	α-Gliadin 41-58	+
PQPFPSQQPYLQLQPFPPQ	α-Gliadin 46-63	+
PQPQLPYPQPQLPY	α-Gliadin 62-75/(d)	+ /+++
QLQPFPPQPQLPY	α-Gliadin 57-68 (d)	+ /+++
QLQPFPPQ	α-Gliadin 57-63 (d)	+++
LQLQPFPPQPQLPYPQPQLPYPQPQLPYPQPQPF	α-Gliadin 56-88/(d)	+ /+++
PQPQLPYPQPQLPY	α-Gliadin 62-75/(d)	+ /+++
PFRPQQPYPQPQPQ	α-Gliadin 93-106 (d)	+
LIFCMDVVLQ	α-Gliadin 123-132	+
QQPLQQYPLGQGSFRPSQQNPQAQG	α-Gliadin 198-222	+
QYPLGQGSFRPSQQNPQA	α-Gliadin 203-220/(d)	+ /+
PSGQGSFQPS	α-Gliadin 205-214	-
PSGQGSFQPSQQ	α-Gliadin 205-216/(d)	+ /+++
SGQGSFQPSQQN	α-Gliadin 206-217/(d)	+ /+++
QGSFQPSQQN	α-Gliadin 208-217/(d)	- /+++
LQPQQPFPPQQPYPQPQPQ	γ-Gliadin 60-79	+
FPQQPQQPYPQPQPQ	γ-Gliadin 66-78	+
FSQPQQQFPQPQ	γ-Gliadin 102-113/(d)	- /+
OQPQQSFPEQQ	γ-Gliadin 134-153/(d)	+ /+++
VQGQGIIQPQQPAQL	γ-Gliadin 222-236/(d)	+ /+
QQQQPPFSQQQQSPFSQQQQ	Glutenin 40-59/(d)	- /+
QQPPFSQQQQPLPQ	Glutenin 46-60/(d)	- /+
SGQGQRPGQWLQPGQGQQGYPTSPQQSGQGQQLGQ	Glutenin 707-742/(d)	+ /+
PGQGQQGYPTSPQQSGQ	Glutenin 719-736	+
GYPTSPQQSGQGQQLGQ	Glutenin 725-742	+
GYPTSPQQSG	Glutenin 725-735	+
QGYPTSPQQS	Glutenin 724-734/(d)	+ /-
QQGYPTSPQQSG	Glutenin 723-735	+
GQQGYPTSPQQSG	Glutenin 722-735	+
GQQGYPTSPQQS	Glutenin 722-734	+

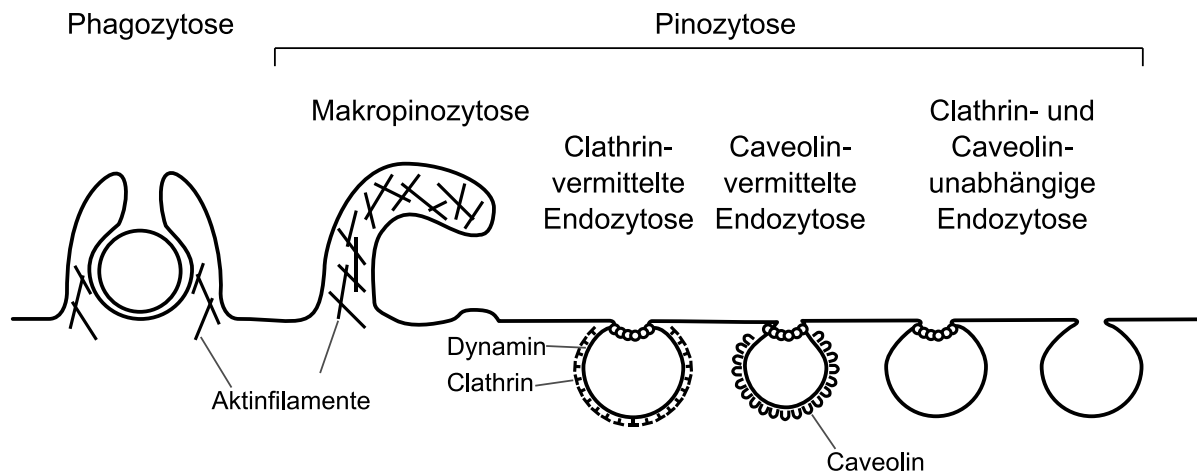
+ = immunogen, +++ = immundominant, (d) = deamidiert

Zum Schutz der Zöliakie-Patienten vor Glutenverunreinigungen in Produkten, die als glutenfrei ausgezeichnet werden, wurden Grenzwerte für die Konzentration von Gluten in entsprechend deklarierten Lebensmitteln festgelegt. Gemäß dem *Codex Alimentarius* von 2008 [38] darf ein Lebensmittel als glutenfrei deklariert werden, wenn die Konzentration an Gluten von 20 mg/kg (20 ppm) nicht überschritten wird. Mit Einhaltung einer glutenfreien Diät, basierend auf diesem Grenzwert, sollte sich die Glutenaufnahme auf unter 10 mg pro Tag beschränken lassen [6].

### 1.3 Intestinale Permeabilität von Nahrungsantigenen

Um mit dem intestinalen Immunsystem in Kontakt zu kommen, müssen oral aufgenommene Antigene die intestinale epitheliale Barriere überwinden. Die Darmpermeabilität wird dabei von intestinalen Strukturen z.B. den *Tight Junctions* bestimmt, die die parazelluläre Diffusion kontrollieren. Während dadurch parazellulär die Diffusion von Ionen und Molekülen mit geringem Molekulargewicht ( $< 5.500$  Da) ermöglicht wird, können über den transzellulären vesikulären Transport auch größere Moleküle zur *Lamina propria* gelangen. Der transzelluläre Transport kann über M-Zellen oder Enterozyten erfolgen. Auch ein Transport über ins Lumen reichende Fortsätze dendritischer Zellen (*dendritic cell*, DC) wird diskutiert [39]. Während der Transzytose durch Enterozyten kann es zur teilweisen Degradation von Proteinen und Peptiden in lysosomalen Kompartimenten kommen, sodass diese in Form von Aminosäuren (komplette Degradation) oder Peptiden (partielle Degradation) basolateral freigesetzt oder intakt an der basolateralen Membran mittels MHC-Molekülen präsentiert werden [40–42].

Die Aufnahme von Makromolekülen durch Enterozyten erfolgt durch Invagination der apikalen Membran in Form von Vesikeln, der sogenannten Endozytose. Die Endozytose lässt sich formal in die Phagozytose, die Aufnahme großer Partikel, und die Pinozytose, die Aufnahme von Flüssigkeit und den darin gelösten Stoffen, unterteilen [40,43]. Bei der Pinozytose lassen sich mindestens vier verschiedene Mechanismen unterscheiden: Makropinozytose, Clathrin-vermittelte Endozytose, Caveolae-vermittelte Endozytose sowie Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytosemechanismen (Abb. 1-9) [44,45].



**Abb. 1-9: Typen der Endozytose.** Formale Aufteilung der Endozytose in Phagozytose (Aufnahme großer Partikel) und Pinozytose (Aufnahme von Flüssigkeit und den darin gelösten Stoffen). Aufteilung der Pinozytose in Makropinozytose (Aktin-getriebene Formation von Membranausstülpungen), Clathrin-vermittelte Endozytose (Clathrin-ummantelte Einstülpungen), Caveolae-vermittelte Endozytose (Caveolin-ummantelte Einstülpungen) und Clathrin- und Caveolae-unabhängige Endozytose (Zusammenfassung unterschiedlicher, bisher wenig bekannter, Mechanismen). Adaptiert nach [41,45].

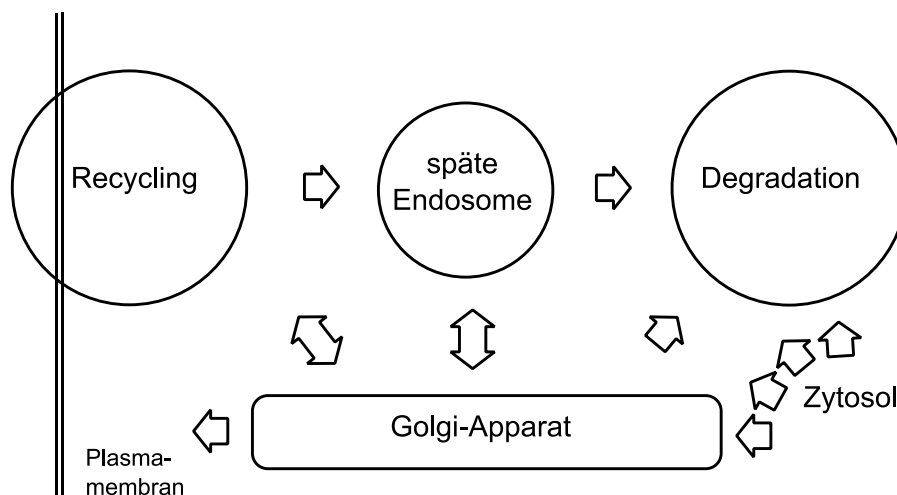
Durch die Expression von Oberflächenmolekülen, die als Antigenrezeptoren dienen, kann die Aufnahme bestimmter Antigene durch rezeptorabhängige Endozytose erhöht werden. So kann die Bindung von Antigenen an Immunkomplexe und deren Interaktion mit Rezeptoren auf der Enterozytenoberfläche zu einer rezeptorabhängigen Endozytose führen. Beispielsweise interagieren Antigene, die an sekretorisches Immunglobulin (slg) A gebunden sind, mit CD71, Immunglobulin (Ig) G gebundene Antigene mit FcRn-Rezeptoren und IgE gebundene Antigene mit CD23. Durch die Bindung an Immunglobuline werden die Antigene außerdem vor dem Abbau in lysosomalen Kompartimenten bewahrt [40,41].

Auch das von *Vibrio cholerae* produzierte Cholera-toxin kann über seine nicht-toxische Untereinheit B (CTB) an ein Oberflächenmolekül binden und dadurch endozytiert werden. Die Kopplung von Antigenen an CTB wird hierbei therapeutisch genutzt, um immunstimulatorische [46,47] oder immunsuppressive [48,49] Effekte auszuüben. Dabei wird CTB chemisch mit einem Antigen konjugiert, um über den Gangliosid (GM1) -Rezeptor endozytiert zu werden. Der GM1-Rezeptor ist auf der enterozytären Oberfläche bevorzugt mit *Lipid Rafts* assoziiert. Die endozytotische Aufnahme kann hierbei, je nach Zelltyp, Clathrin-abhängig, Caveolar-abhängig oder Clathrin- und Caveolar-unabhängig erfolgen. [50]

Auch pathologische Faktoren haben Einfluss auf die Antigenaufnahme bzw. transzelluläre Permeabilität. So wurde bei Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa eine gesteigerte epitheliale Antigenaufnahme beobachtet [51]. Diese könnte im

Zusammenhang mit einer erhöhten Expression von inflammatorischen Zytokinen stehen. Unter dem Einfluss von Interferon (IFN)  $\gamma$  konnte eine gesteigerte Transzytose von Antigenen im Zellkulturmodell nachgewiesen werden. Auch konnte gezeigt werden, dass Zöliakie-spezifische intestinale T-Zellen durch Stimulation mit Gluten die Sekretion von IFN- $\gamma$  und dadurch auch die Transzytose von Glutenpeptiden steigern [52]. Dies konnte bei Tumornekrosefaktor (TNF)  $\alpha$  nicht beobachtet werden. Allerdings wird TNF- $\alpha$  mit der erhöhten endosomalen Antigenaufnahme bei Morbus Crohn und Colitis ulcerosa in Verbindung gebracht [53].

Nach der endozytotischen Aufnahme erfolgt die endosomale Reifung oder das Recycling der Endosome zurück in die Zytoplasmamembran. Dabei lässt sich die Endozytose in wenige Basiselemente aufteilen (Abb. 1-10). Diese beinhalten das Recycling der Plasmamembran und deren Liganden, die Degradation zum Verdau von Makromolekülen sowie die einseitig gerichtete Verbindung zwischen Recycling und Degradation durch späte Endosome. Zusätzlich stehen diese Elemente im Austausch mit dem *trans*-Golgi-Netzwerk, wodurch weitere Membranelemente oder lysosomale Komponenten in das endosomale System gelangen.



**Abb. 1-10: Basiselemente der Endozytose.** Adaptiert nach [54].

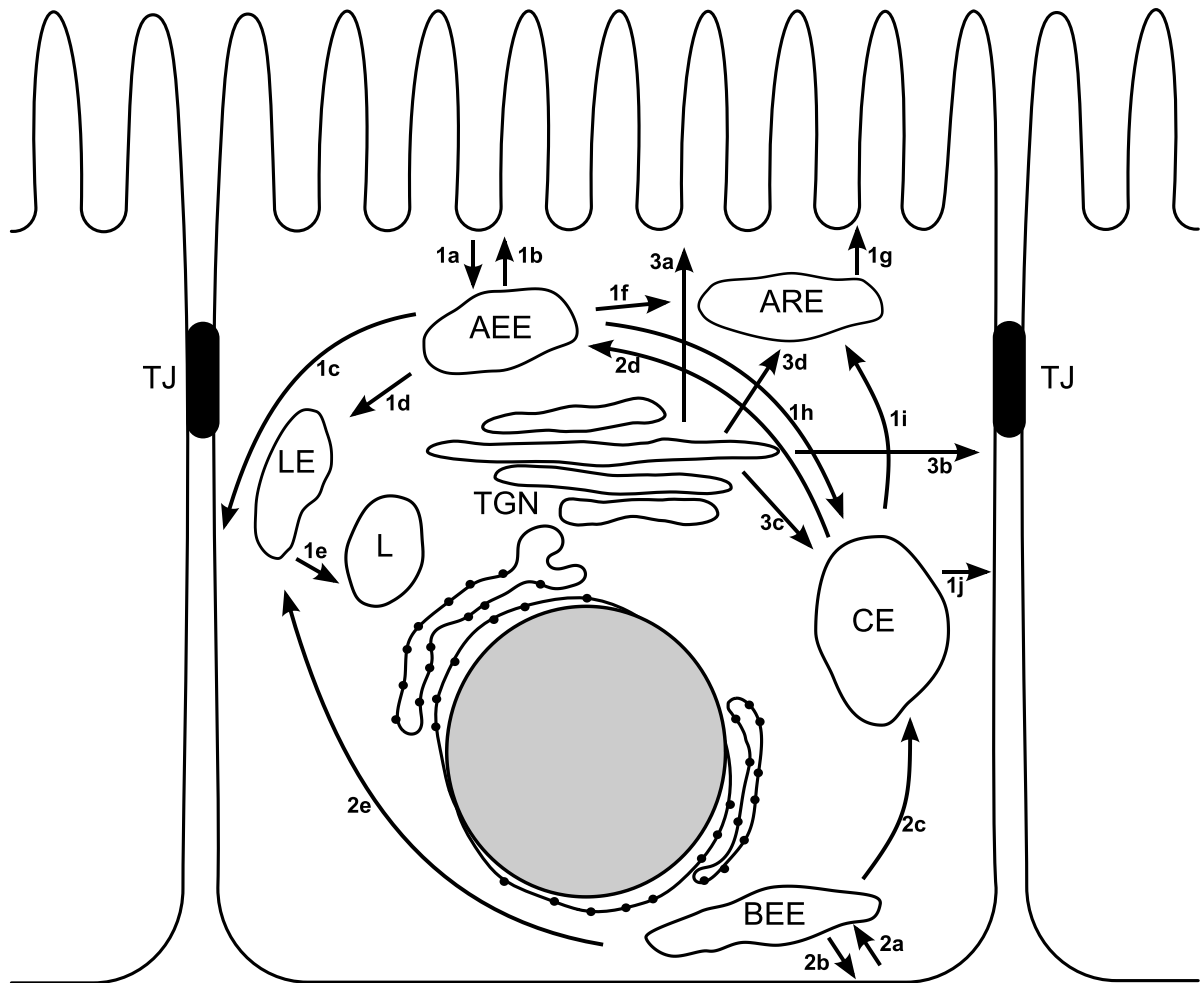
Nach erfolgter Endozytose gehen die primären endozytotischen Vesikel in frühe Endosome über, in denen sich intraendosomale Vesikel bilden. Nach etwa 8 - 15 min erfolgt die Umwandlung von frühen in späte Endosome, bei der die Anzahl intraendosomale Vesikel ansteigt. Die Größe und Morphologie des Vesikels ändern sich und der Recyclingprozess sowie die Fusion mit frühen Endosomen finden nicht länger statt. Auf dem Weg zum perinukleären Raum fusionieren späte Endosome

untereinander und mit Lysosomen. Durch diesen Reifungsprozess gehen diese zuerst in Endolysosome und dann in Lysosome über, in welchen der Verdau der aufgenommenen Makromoleküle stattfindet. Während der Reifung besteht zwischen Endosomen und dem *trans*-Golgi-Netzwerk ein fortlaufender Austausch, wodurch lysosomale Hydrolasen und Membranbestandteile hinzugefügt und endosomale Komponenten entfernt werden [54–56]. Auch erfolgt eine Ansäuerung wodurch sich der pH-Wert in frühen Endosomen zwischen 6,8 – 6,1, in späten Endosomen zwischen 6,0 - 4,8 und in Lysosomen auf ca. 4,5 einstellt [54].

Alternativ kann in polarisierten Zellen auch ein Transport der frühen oder späten Endosome zur gegenüberliegenden Membran erfolgen, der sogenannten Transzytose (Abb. 1-11) [41,54,56]. Bei einer Freisetzung durch frühe Endosome werden die endozytierten Antigene intakt auf der basolateralen Seite freigesetzt. Antigene, die in späten Endosomen aufgenommen wurden, können prozessiert und deren Peptide über MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II-Moleküle auf der Oberfläche des Enterozyts präsentiert werden. Auch kann es zu einer Freisetzung der endozytotischen Vesikel kommen, der sogenannten Exosomen. Diese können ebenfalls durch MHC-Moleküle gebundene Antigene tragen. Durch deren Freisetzung erhalten diese Zugang zur *Lamina propria* [57,58,40].

Die Koordination des Transportwegs zu den unterschiedlichen Kompartimenten erfolgt über unterschiedliche Rab-Proteine auf der zytosolischen Oberfläche der Endosome [41,54,56].





**Abb. 1-11: Endozytotische Transportprozesse in polarisierten Epithelzellen.** Die Abgrenzung der apikalen von der basolateralen Oberfläche erfolgt durch *Tight Junctions* (TJ). Nach Internalisierung werden Flüssigkeit und Membranbestandteile (1a) zum apikalen frühen Endosom (AEE) oder (2a) basalen frühen Endosom (BEE) transportiert. Internalisiertes Material vom AEE kann (1b) recycelt, (1c) transzytiert oder (1d) zu späten Endosomen (LE) und (1e) letztlich zu Lysosomen (L) transportiert werden. Alternativ kann endozytiertes Material (1f) zu apikalen Recycling-Endosomen (ARE) oder (1h) zu den gewöhnlichen Endosomen (CE) transportiert werden. (1g) Ausgehend von ARE kann wiederum ein Recycling stattfinden. CE können über ARE ebenfalls (1i) recycelt werden oder (1j) das eingeschlossene Material auf die basolaterale Seite transzytieren. Ausgehend vom BEE kann internalisiertes Material (2b) recycelt, (2c) zu CE oder (2e) zu LE transportiert werden. Durch den Transport mittels CE kann das endozytierte Material (1j) recycelt oder (2d/1b) über AEE bzw. (1i/1g) ARE transzytiert werden. (1e) Über LE ist wiederum der Übergang in L möglich. Neu synthetisierte Membranproteine können nach Sortieren im *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) direkt zur (3a) apikalen oder (3b) basolateralen Oberfläche transportiert werden. Vesikel vom TGN können auch mit endozytiertem Material interagieren, wahrscheinlich über (3c) CE und / oder (3d) ARE. AEE: frühes Endosom; ARE: Recycling-Endosom; BEE: basalen frühen Endosom; CE: gewöhnliches Endosom; L: Lysosom; LE: spätes Endosom; TGN: *trans*-Golgi-Netzwerk; TJ: *Tight Junction*. Adaptiert nach [41].

Der parazelluläre Transport kann durch Beeinflussung der *Tight Junctions* reguliert werden. Durch die Aktivierung apikaler Membrantransportsysteme können *Tight Junctions* erweitert werden, was zu einer erhöhten Einstromung gelöster Stoffe und somit zur gesteigerten Permeabilität für luminales Material führt. Der Radius von geöffneten *Tight Junctions* beträgt ca. 5 nm und ermöglicht das Passieren von kleinen Makromolekülen bis 5.500 Da, wobei die parazelluläre Aufnahme von

größeren Makromolekülen diskutiert wird. Da auch kleine toxische und immunogene Gliadinpeptide im Bereich von 1.500 bis 1.600 Da existieren, ist auch ein parazellulärer Transport dieser Peptide denkbar.

Neben dem Einfluss von Transportsystemen spielen auch pathologische Faktoren bei der parazellulären Permeabilität eine Rolle. Interaktionen der apikalen Membran mit Mikroorganismen sowie verschiedenen Toxinen können zur gesteigerten Permeabilität der *Tight Junctions* führen, wobei dieser Effekt teilweise auch auf die Sekretion von Zytokinen zurückzuführen ist. IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , Interleukin (IL) -1 $\beta$ , IL-4 und IL-13 interagieren mit epithelialen Rezeptoren, wodurch die Permeabilität der *Tight Junctions* gesteigert wird. Im Gegensatz dazu führen der Transformierende Wachstumsfaktor (*transforming growth factor*, TGF) - $\beta$  und IL-10 zu einer Verstärkung der epithelialen Barriere. Auch einige Wachstumsfaktoren haben einen steigernden (Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (*fibroblast growth factor*, FGF) und Epidermaler Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF)) bzw. hemmenden (Insulinähnliche Wachstumsfaktoren (*insulin-like growth factor*, IGF)) Effekt auf die parazelluläre Permeabilität. Des Weiteren werden die Barriereeigenschaften des Epithels vom intestinalen Nervensystem durch cholinerge Neurotransmitter beeinflusst, die zu einer erhöhten Permeabilität führen [12].

## 1.4 Das Immunsystem

Der menschliche Organismus ist über die Haut, den Respirations- und den Gastrointestinaltrakt in ständigem Kontakt mit Umwelteinflüssen, denen physikalische, chemische und mikrobiologische Barrieren entgegenstehen, die sich zu einer immunologischen Barriere zusammenfügen. Überwinden Antigene wie Gliadinpeptide die epitheliale Barriere, kommen sie in Kontakt mit dem Immunsystem. Hierbei kann man zwischen einem angeborenen unspezifischen und dem erworbenen spezifischen Immunsystem unterscheiden. Bei der Initiation von Zöliakie wird ein Zusammenspiel des angeborenen und des spezifischen Immunsystems vermutet [9].

### 1.4.1 Das unspezifische Immunsystem

Werden äußere Schutzbarrieren durch Pathogene überwunden, kommt es in dieser Region zur Aktivierung von Immunzellen des unspezifischen (angeborenen)

Immunsystems [59]. Im Fall von Zöliakie wird das Eindringen toxischer Gliadinpeptide mit der Initiierung einer unspezifischen Immunantwort verbunden [9] (siehe Abschnitt 1.5.1). Die Aktivierung von Zellen des angeborenen Immunsystems bewirkt die Rekrutierung weiterer Immunzellen. Phagozyten wie Granulozyten, gehören zu den ersten Zellen, die den Infektionsort erreichen, Infektionserreger aufnehmen und lysosomal degradieren. Diese werden von Mastzellen unterstützt, die zur Ausschüttung von Enzymen und toxischen Substanzen befähigt sind. Als weitere phagozytierende Zellen dringen Monozyten in infizierte Regionen ein, wo sie zu Makrophagen oder DC reifen können. Diese können pathogene Strukturen, sogenannte *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) durch Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptor*, PRR) erkennen. Makrophagen und DC gehören zu den antigenpräsentierenden Zellen (APZ). Sie sind in der Lage, aufgenommene Pathogene zu verdauen und entstandene Peptide durch MHC-Moleküle auf ihrer Oberfläche T-Zellen zu präsentieren. Im Gegensatz zu Makrophagen, die nur begrenzt dazu fähig sind, naive T-Zellen zu aktivieren, werden durch DC weitere Informationen, wie Stärke, Art und Ort der Entzündung, an T-Zellen vermittelt. Mittels DC wird daher festgelegt, welche Immunreaktion erfolgt und eine wichtige Brücke zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem gebildet. Des Weiteren gehören auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) zum angeborenen Immunsystem. Durch zytotoxische Mechanismen sind sie dazu befähigt, kranke Zellen zu eliminieren. Durch Zytokinproduktion fördern sie zudem die Immunzellaktivierung.

Lösliche Faktoren unterstützen die Zellen des angeborenen Immunsystems. Hierzu zählt das Komplementsystem, das auf pathogenen Zellen zur Bildung von Membranporen und letztlich zur Lyse der Zelle führt. Durch diesen Prozess werden weitere Immunzellen in die Abwehrreaktion miteingebunden. Darüber hinaus zählen zu den löslichen Faktoren die Zytokine, welche die Zusammenarbeit des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem ermöglichen. Diese Botenstoffe können von verschiedenen aktivierten Zellen freigesetzt werden und mit Rezeptoren anderer Zellen interagieren, wodurch sie die Interaktion von Leukozyten mit anderen Zellen regulieren, Immunreaktionen auslösen und modulieren, die Proliferation und Differenzierung von Zellen hervorrufen oder auch antiviral wirken können. Der zu den Zytokinen zählende TNF- $\alpha$  besitzt pleiotrope Wirkungsweisen und spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion von Apoptose und entzündlichen Reaktionen, was bei

entzündlichen Erkrankungen zur Entstehung von intestinalen Läsionen führen kann. Auch bei Patienten mit aktiver Zöliakie wurde im Bereich der intestinalen *Lamina propria* über ein erhöhtes Vorkommen von TNF- $\alpha$ -sezernierenden Zellen berichtet [60–62]. Als eine Gruppe der Zytokine induzieren Chemokine wie IL-8 die Rekrutierung und Chemotaxis von Leukozyten sowie die Aktivierung von Lymphozyten, wodurch sie als Mediatoren für Entzündungsreaktionen dienen [59,63]. Auch für IL-8 wurde in Biopsien von Zöliakie-Patienten eine gesteigerte Produktion nachgewiesen [64]. Im Gegensatz zu den proinflammatorischen Zytokinen tragen immunsuppressive Zytokine zur Aufrechterhaltung der oralen Toleranz bei. Neben IL-10 wird auch TGF- $\beta$  eine solche Funktion zugeordnet [65].

### 1.4.2 Das spezifische Immunsystem

Wenn die unspezifischen Abwehrmechanismen durch einen Erreger überwunden wurden, kann dieser durch die spezifische (adaptive) Immunantwort eliminiert werden. Das adaptive Immunsystem ist zur Anpassung gegenüber neuen Krankheitserregern befähigt. Zellen der spezifischen Immunabwehr sind in der Lage, charakteristische Antigene von Erregern zu identifizieren, gegen diese gezielt Antikörper zu bilden und Mechanismen zur Abwehr einzuleiten [66]. Im Fall der Zöliakie werden immunogene Gliadinpeptide durch Zellen des spezifischen Immunsystems identifiziert, was zu einer inflammatorischen Immunantwort führt [67]. Induziert wird die adaptive Immunantwort durch APZ, meist DC. Unreife DC (*immature dendritic cell*; iDC) entwickeln sich durch den Einfluss unterschiedlicher Faktoren (siehe Abschnitt 1.5.2) zu reifen DC. Diese präsentieren an ihrer Oberfläche Antigene des Erregers sowie kostimulatorische Moleküle und sezernieren Zytokine. Bei Erkennung eines Antigens durch naive T-Zellen teilen sich diese und differenzieren zu T-Effektorzellen. T-Effektorzellen verlassen den Lymphknoten und wandern in periphere Gewebe. Die Effektorfunktion wird dann ausgelöst, wenn diese ein für sie spezifisches Antigen präsentiert bekommen. Die Art der Differenzierung von naiven T-Zellen wird durch DC bestimmt [66,68].

T-Effektorzellen können mit Zellen interagieren, die das spezifische Antigen auf ihrer Oberfläche tragen. Durch unterschiedliche T-Effektorzellen können verschiedene Funktionen vermittelt werden. Zytotoxische CD8<sup>+</sup> T-Zellen führen durch Sekretion von Perforinen, Proteasen und Zytokinen vor allem zur Induktion der Apoptose. Eine

Stimulation der Aktivierung von Makrophagen erfolgt durch die  $CD4^+$  Typ1-T-Helferzellen ( $T_H1$ -Zellen). Die zytotoxischen  $CD8^+$  T-Zellen und die  $CD4^+$   $T_H1$ -Zellen bilden zusammen die zellvermittelte Immunantwort. Die humorale Immunantwort wird durch die Sekretion von Antikörpern durch die B-Zellen vermittelt. Deren Aktivität wird sowohl durch  $CD4^+$   $T_H1$ - als auch durch  $CD4^+$   $T_H2$ -Zellen koordiniert.  $T_H17$ -Zellen leiten neutrophile Granulozyten zur Stelle der Infektion und verstärken dadurch die akuten Entzündungsreaktionen. Eine Begrenzung der Immunantwort erfolgt durch  $CD4^+$  regulatorische T-Zellen ( $T_{Reg}$ ) [66].

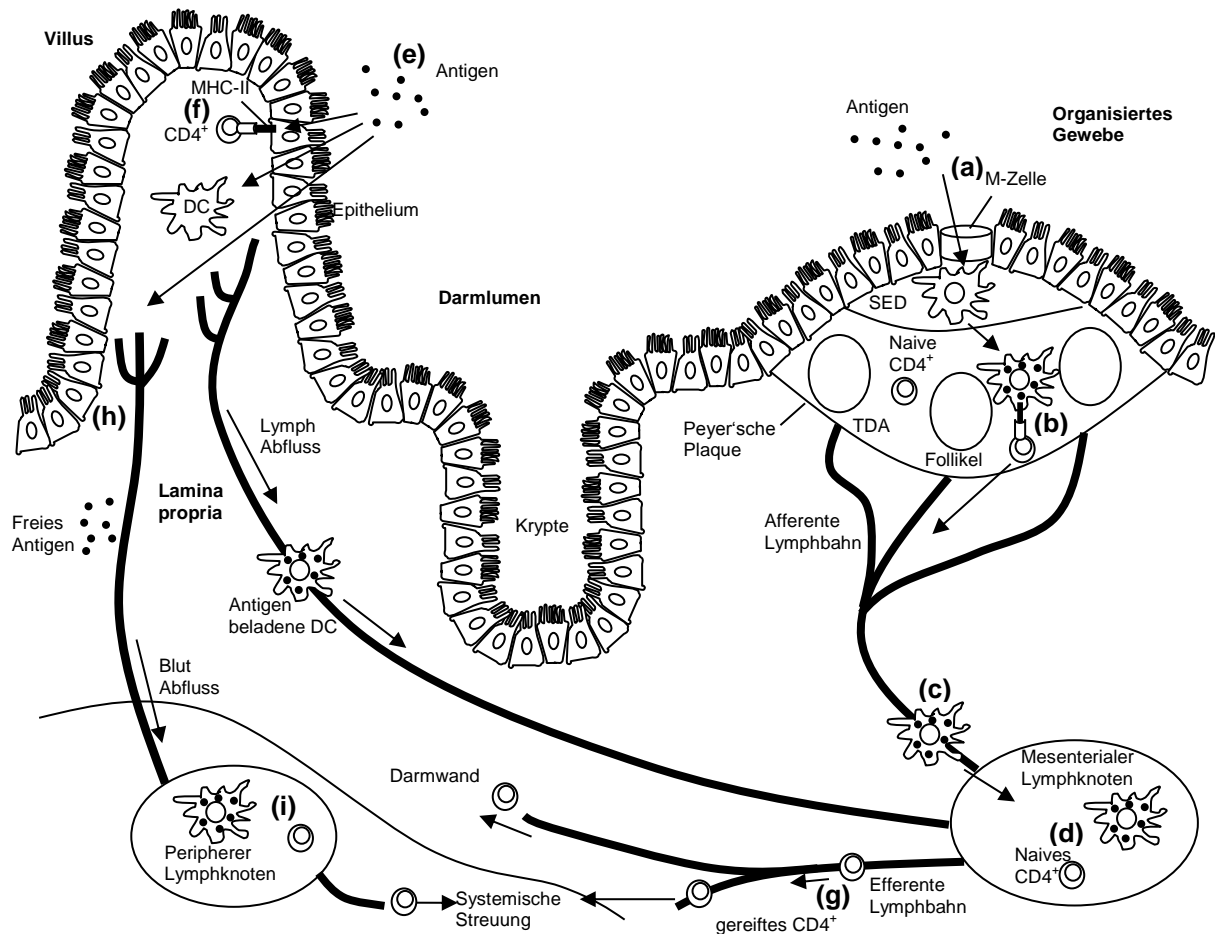
### 1.4.3 Das darmassoziierte Immunsystem

Den größten und komplexesten Teil des Immunsystems macht das intestinale Immunsystem aus. Durch die Aufnahme von Antigenen mit der Nahrung muss das intestinale Immunsystem zwischen pathogenen und ungefährlichen Antigenen unterscheiden können. Im Fall von Zöliakie-Patienten werden Gliadinpeptide als pathogen identifiziert, was eine inflammatorische Immunantwort auslöst.

Das darmassoziierte Immunsystem setzt sich aus verstreutem und organisiertem lymphatischem Gewebe zusammen. Bei ersterem sind die Lymphozyten über das Epithel und die darunter liegende *Lamina propria* der Mukosa verteilt. T-Zellen der *Lamina propria* weisen bei Antigenstimulation nur eine geringe Proliferationsrate auf, produzieren aber auch ohne eine vorhandene Entzündung großer Mengen an Zytokinen wie  $IFN-\gamma$ , IL-5 und IL-10. Der Anteil der  $CD4^+$  T-Zellen ist in der *Lamina propria* höher als der Anteil der  $CD8^+$  T-Zellen. Dagegen besteht ein Großteil der IEL aus  $CD8^+$  T-Zellen. Bei diesen geht man von zwei unterschiedlichen Gruppen aus. Die konventionellen zytotoxischen  $CD8^+$  T-Zellen, die auch als IEL Typ a bezeichnet werden, identifizieren MHC-Klasse-I-gebundene Peptide aus intraepithelialen Pathogenen auf der Oberfläche von Epithelzellen. Als Folge einer Aktivierung kommt es zur Induktion der Apoptose der antigentragenden Epithelzelle. IEL Typ b interagieren dagegen mit Epithelzellen, die ein verändertes Zellwachstum aufweisen oder erhöhtem Stress ausgesetzt sind. Diese Epithelzellen exprimieren auf ihrer Oberfläche *MHC class I chain-related molecule A* und B (MICA und MICB) und sezernieren IL-15, wodurch es zur Aktivierung und Interaktion mit angrenzenden IEL vom Typ b kommt. Auch diese eliminieren die betroffene Epithelzelle [63,60].

Das als darmassoziiertes lymphatisches Gewebe (*gut-associated lymphoid tissue*, GALT) bezeichnete organisierte Gewebe setzt sich aus den Peyer'schen Plaques, den mesenterialen Lymphknoten und den isolierten Lymphfollikeln zusammen (Abb. 1-12). Die Peyer'schen Plaques enthalten abgetrennte T-Zell-Regionen und B-Zell-Follikel, während die isolierten Lymphfollikel vor allem aus B-Zellen bestehen. Die lymphatischen Gewebe werden durch den subepithelialen Dom und das follikelassoziierte Epithelium vom Darmlumen getrennt. Das follikelassoziierte Epithel enthält eine große Anzahl an Makrophagen, DC, B- und T-Zellen. DC werden durch Chemokine, welche durch Epithelzellen konstitutiv sezerniert werden, in die Peyer'schen Plaques gelockt. Zwischen den Epithelzellen befinden sich M-Zellen, die durch Transzytose Antigene von der apikalen auf die basolaterale Seite des Epithels transportieren. Dort werden die Antigene durch APZ, wie DC, aufgenommen und mittels Antigen / MHC-Komplexen naiven T- und B-Zellen präsentiert.

Antigene oder APZ können über die Lymphbahnen auch in die mesenterialen Lymphknoten gelangen und dort an Lymphozyten präsentiert werden. Die in den mesenterialen Lymphknoten differenzierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen wandern ins Blut und migrieren durch Interaktion mit Adhäsionsmolekülen und Chemokinen in die *Lamina propria* der Mukosa [69,66].



**Abb. 1-12: Darmassoziiertes lymphatisches Gewebe.** (a) Mittels M-Zellen können Antigene durch das follikelassoziierte Epithel (FAE) in den subepithelialen Dom (SED) gelangen. (b) Dort werden die Antigene an DC weitergeleitet, welche diese an T-Zellen in den Peyer'schen Plaques präsentieren. (c) Antigene und antigenpräsentierende DC können auch Zugang zu den drainierenden Lymphknoten erlangen, (d) mit darauf folgender T-Zell-Erkennung in den mesenterialen Lymphknoten (MLN). (e) Eine ähnliche Verbreitung von Antigenen oder APZ zu MLNs kann durch Eindringen von Antigenen durch das Epithel der Villi geschehen. (f) Hierbei können aber auch Epithelzellen durch MHC-Klasse-II-Moleküle Antigene präsentieren. (g) In beiden Fällen verlassen die  $CD4^+$ -T-Zellen die MLN, betreten den Blutkreislauf und gelangen durch Gefäße in die *Lamina propria* der Mukosa. (h) Antigene können auch direkten Zugang zur Blutbahn erlangen und (i) mit T-Zellen peripherer Lymphknoten interagieren. TDA = thymusabhängige Region. Adaptiert nach [69].

## 1.5 Interaktion von Gliadinpeptiden mit dem darmassoziierten Immunsystem

Als Voraussetzung für eine Gluten-vermittelte Immunantwort müssen immunogene bzw. toxische Gliadinpeptide Zugang zur *Lamina propria* erhalten. Mit der Nahrung aufgenommene Proteine werden durch Proteasen aus Magen und Pankreas verdaut. Anschließend werden diese durch Peptidasen, die auf der Bürstensaummembran der Dünndarmenterozyten lokalisiert sind, zu einzelnen Aminosäuren, Di- oder Tripeptiden hydrolysiert. Des Weiteren können Antigene auf dem endozytotischen Weg in Enterozyten degradiert werden. Jedoch sind die meisten intestinalen

Proteasen nicht fähig prolinreiche Peptide abzubauen. Es wird daher angenommen, dass Gliadinpeptide, die einen hohen Prolinanteil enthalten, resistent gegenüber proteolytischem Abbau sind und sie daher auf parazellulärem oder transzellulärem Weg Zugang zur *Lamina propria* erhalten könnten [70,71].

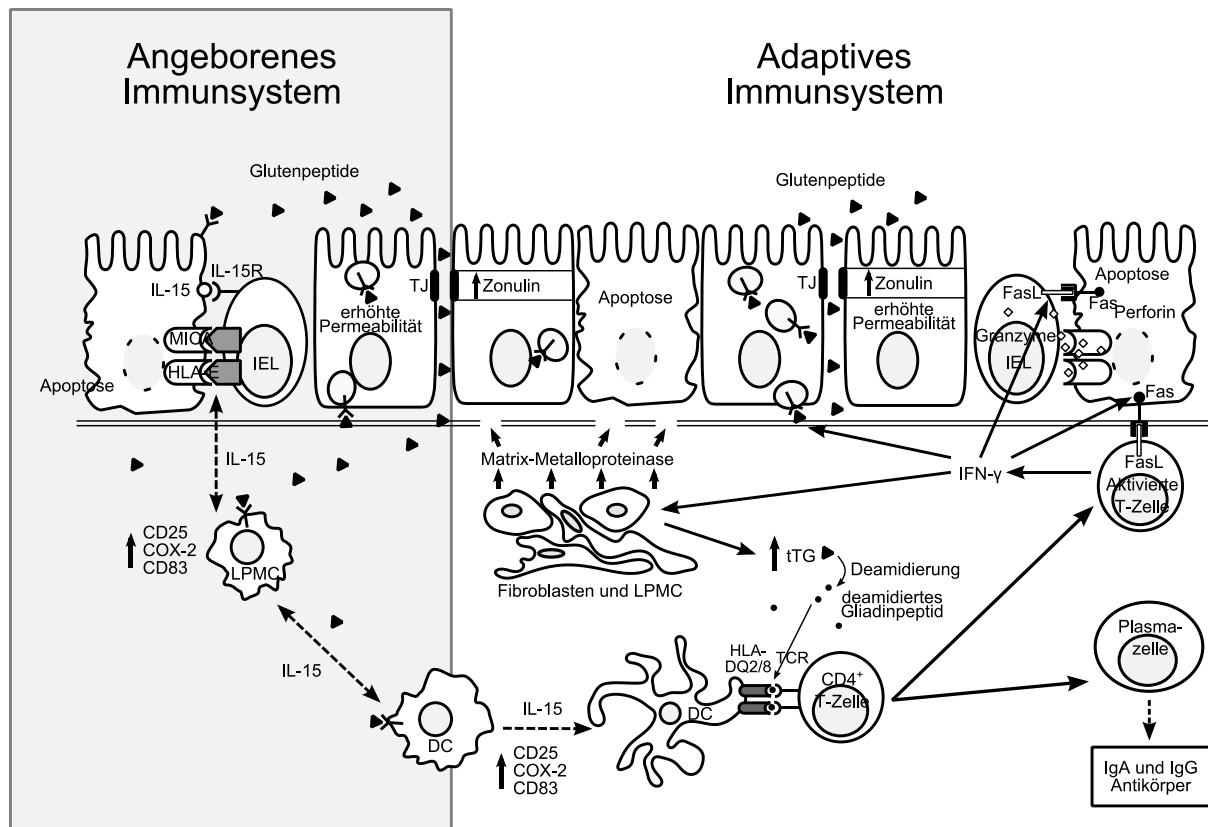
### 1.5.1 Interaktion mit dem angeborenen Immunsystem

Einige Autoren gehen davon aus, dass die Induktion des angeborenen Immunsystems durch toxische Gliadinpeptide, wie P31-43 und P31-49, als ein Initialereignis im Rahmen der Pathogenese der Zöliakie zu betrachten ist. Bei intraduodenaler Gabe und *In-vitro*-Inkubationen von Biopsien konnte gezeigt werden, dass P31-43 oder P31-49 innerhalb kurzer Zeit Änderungen induzieren, die im Zusammenhang mit der Zöliakie stehen. Hierzu zählten die erhöhte Sekretion von Zytokinen sowie die gesteigerte Apoptose der Enterozyten und Villusatrophie [72–75]. Diese als toxisch bezeichneten Gliadinpeptide scheinen dabei eine angeborene Immunantwort auszulösen. Am Beispiel des toxischen Gliadinpeptids P31-43 konnte gezeigt werden, dass dieses ohne eine Bindung an HLA-DQ2 oder –DQ8 und ohne eine Interaktion mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine gesteigerte IL-15 Expression induziert [29,75]. Das proinflammatorische Zytokin IL-15 wird bei Patienten mit aktiver Zöliakie sowohl von Zellen der *Lamina propria* als auch von intestinalen Epithelzellen exprimiert. IL-15 führt zur Expression des Stressmoleküls MICA auf Enterozyten und erhöht die Anzahl der NKG2D Rezeptoren auf IEL. Die Interaktion zwischen dem enterozytären MICA und dem lymphozytären NKG2D führt zu einer direkten Zerstörung der Enterozyten. Darüber hinaus führt eine Stimulation durch IL-15 zu einer Wachstumsstimulation für IEL sowie zur Expansion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, CD8<sup>+</sup> T-Zellen, NK-Zellen, natürlichen Killer T-Zellen (NKT-Zellen) und T-Zell Rezeptor (TCR)  $\gamma/\delta$ -positiven Zellen. Dadurch kann die stimulatorische Kapazität von immundominanten Gliadinpeptiden und eine daraus folgende adaptive Immunantwort verstärkt werden [75,29,76]. Durch Inflammation oder zellulärem Stress werden auf Enterozyten außerdem verstärkt MICA, MICB und HLA-E Moleküle exprimiert. Diese interagieren mit NK-Zellen und TCR- $\gamma/\delta$ -positiven Zellen, wodurch es zur erhöhten Zytokinproduktion und weiteren zytotoxischen Reaktionen des angeborenen Immunsystems kommt [29,77].



Bisher ist nicht genau bekannt, ob Enterozyten, Makrophagen, DC oder andere Zellen in der intestinalen Mukosa direkt durch toxische Gliadinpeptide aktiviert werden. Auch ist bisher unklar, über welche Rezeptoren und Mechanismen diese Wirkung vermittelt wird und ob diese Effekte nur für Zöliakie spezifisch sind [76]. Des Weiteren scheinen toxische Gliadinpeptide neben ihren direkten toxischen Effekten auch die Wirkung von immunogenen Gliadinpeptiden und dadurch eine adaptive Immunantwort zu unterstützen [67].

DC bilden die Verbindung zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem. Die Reifung und Zytokinsekretion von DC zählt dabei zu den angeborenen Immunreaktionen, die durch die Interaktion mit T-Zellen zu einer adaptiven Immunantwort gegenüber den verabreichten Antigenen führen kann [78].

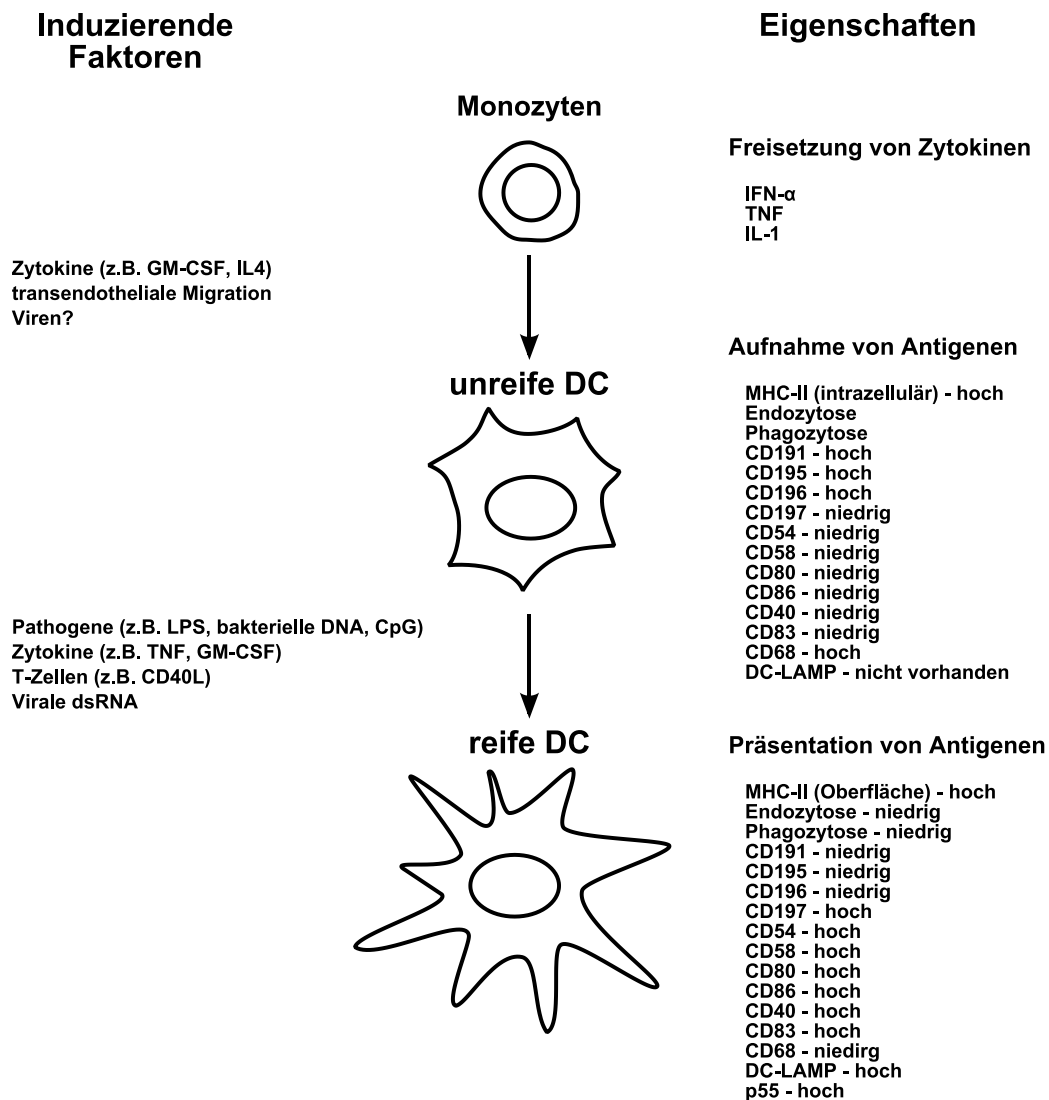


**Abb. 1-13: Modell des epithelialen Transports und der Immunerkennung von Gluten bei Zöliakie.** Glutenpeptide passieren das intestinale Epithel entweder über den parazellulären oder über den transzellulären Weg und erhalten dadurch Zugang zur *Lamina propria*. Dort können Glutenpeptide DC und weitere *Lamina propria* mononukleäre Zellen (*Lamina propria mononuclear cells*; LPMC) aktivieren, die infolge dessen IL-15 produzieren. IL-15 verursacht eine gesteigerte Produktion von Stressproteinen durch Enterozyten, die durch NK-Zell-Rezeptoren auf IEL registriert werden. Daneben werden naive und tTG-deamidierte Glutenpeptide durch reife DC über HLA-DQ2 oder -DQ8 Moleküle an TCR von T-Zellen präsentiert. Dadurch werden CD4<sup>+</sup>-T-Zellen aktiviert, die durch Sekretion proinflammatorischer Zytokine zytotoxische T-Zellen und die Produktion von bestimmten Matrix-Metalloproteinasen stimulieren, welche für die Degradation der extrazellulären Matrix und der Basalmembran verantwortlich sind. Auch aktivierte T-Zellen haben durch Produktion von Molekülen wie Fas Liganden (FasL) sowie Granzymen die Fähigkeit die Apoptose von Enterozyten auszulösen und dadurch charakteristische mukosale Läsionen auszulösen. Stimulierte CD4<sup>+</sup>-T-Zellen können außerdem die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen induzieren. Diese produzieren spezifische Antikörper gegen Gliadin und tTG. Adaptiert nach [29].

### 1.5.2 Reifung dendritischer Zellen unter dem Einfluss von Gliadin

Unter den APZ sind DC die effizientesten antigenpräsentierenden Zellen, die über die Balance zwischen einer Immunantwort und einer Toleranzinduktion entscheiden. Intestinale DC gehen aus Monozyten durch Stimulation mittels IL-4 und *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) hervor. Im Darm kommen DC in unterschiedlichen Kompartimenten vor. Dazu zählen die intestinale *Lamina propria*, die Peyer'schen Plaques und die mesenterialen Lymphknoten. Die Identifizierung von pathogenen Strukturen, wie z.B. Lipopolysacchariden (LPS), durch spezifische Rezeptoren initiieren die Reifung von DC, die durch inflammatorische Stimuli, wie

z.B.  $\text{TNF-}\alpha$  und  $\text{IL-1}\beta$ , oder T-Zell-vermittelte Signale, wie z.B.  $\text{CD40L}$  und  $\text{IFN-}\gamma$ , weiter reguliert werden können. Durch die Aktivierung kommt es zu einer morphologischen, phänotypischen und funktionalen Änderung der DC, was zum Übergang einer antigenaufnehmenden unreifen zu einer reifen DC führt. Dabei ist die Reifung durch eine verringerte Antigenaufnahme und –prozessierung, die Produktion eines weiten Spektrums an Zytokinen und Chemokinen sowie eine erhöhte Expression kostimulatorischer Moleküle charakterisiert (Abb. 1-14). Reife DC bewegen sich zu sekundären lymphatischen Organen, wie den Peyer'schen Plaques, die eine hohe Dichte an T-Zellen aufweisen. Dort induzieren sie eine primäre Immunantwort durch die Stimulation naiver T-Zellen, deren Auswirkung auch durch anwesende Zytokine beeinflusst wird [79,80].



**Abb. 1-14: Reifung intestinaler dendritischer Zellen.** Durch die auf der linken Seite aufgeführten Faktoren erfolgt eine Reifung der Zellen. Die rechte Seite zeigt die wichtigsten Eigenschaften jeder Entwicklungsstufe. Adaptiert nach [80].

Der Einfluss von Gliadin auf die Reifung von Monozyten und DC wurde in einer Reihe von Studien untersucht. So führte die Inkubation von Dünndarmbiopsien mit dem toxischen Gliadinpeptid P31-43 neben erhöhter IL-15 Expression zur verstärkten Expression kostimulatorischer Moleküle auf APZ und zur Aktivierung der p38 *mitogen activated protein kinase* (MAPK). Durch den Einfluss der toxischen Gliadinpeptide bewirkten immundominante Gliadinpeptide die Aktivierung von T-Zellen [70].

Zur genaueren Untersuchung der Reifungsmechanismen wurden die Effekte von proteolytisch umgesetztem Gliadin an isolierten Monozyten oder aus diesen hervorgegangenen DC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die Stimulation von Monozyten mit Pepsin-verdaulichem Gliadin zu einer erhöhten Sekretion von IL-8 und TNF- $\alpha$  führte, was durch Schaffung proinflammatorischer Bedingungen mittels IFN- $\gamma$  nochmals gesteigert werden konnte. Eine vergleichbare Steigerung der Zytokinproduktion konnte auch mit P31-43 erlangt werden, wohingegen es beim Einsatz von P56-88 einen geringeren Anstieg gab. Als Mechanismus wird hier ein *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) abhängiger Weg vermutet. Auch wurde beobachtet, dass eine Gliadin-Stimulation der Monozyten von Patienten mit aktiver Zöliakie eine stärkere Zytokinsekretion bewirkte als bei Zöliakie-Patienten in Remission, welche jedoch eine höhere Sekretion aufwiesen als gesunde Individuen. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass Monozyten von HLA-DQ2-positiven Individuen *per se* durch Stimulation mit IFN- $\gamma$  oder Gliadin zu einer erhöhten IL-8-Sekretion neigen [81]. Die Reifung von Monozyten durch die Oberflächenexpression von Reifungsmarkern konnte durch Gliadin ebenfalls gesteigert werden. Auch hier führte IFN- $\gamma$  zu einem gesteigerten Effekt. Bei der Aktivierung von Monozyten scheinen IFN- $\gamma$  und Gliadin daher synergetische Effekte auszuüben [82,81].

Auch bei DC konnte ein Einfluss von verdaulichem Gliadin auf die Zytokinexpression und Reifung gezeigt werden. In Experimenten, bei denen aus Monozyten gereifte DC mit Pepsin bzw. Pepsin / Trypsin-verdaulichem Gliadin inkubiert wurden, konnte sowohl bei Zöliakie-Patienten als auch bei Gesunden ein Anstieg der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  sowie eine Verringerung von TGF- $\beta$  beobachtet werden. Aufgrund einer erhöhten Sekretion antiinflammatorischer Zytokine bei HLA-DQ2-positiven gesunden Individuen wird eine antiinflammatorische Gegenregulation diskutiert. Unabhängig vom Genotyp des Donors konnte auch eine Reifung der DC beobachtet werden. Hierbei wurde auch gezeigt, dass auf DC von

Zöliakie-Patienten unter einer glutenfreien Diät die Expression einzelner Reifungsmarker und damit deren Reifung reduziert ist. Untersuchungen, die sich mit dem Mechanismus der Reifungsinduktion von DC durch Gliadin beschäftigten, legten eine Beteiligung von NF- $\kappa$ B und p38 MAPK nahe [79,83,84]. In Folge der Entwicklung von antigenaufnehmenden iDC zu antigenpräsentierenden reifen DC ändert sich auch deren T-Zell-stimulatorisches Potential. So konnte eine gesteigerte Proliferation von T-Zellen durch Inkubation mit Gliadin-stimulierten DC ausgemacht werden. Dabei wurde beobachtet, dass durch DC von Zöliakie-Patienten ohne glutenfreie Diät eine höhere Proliferation ausgelöst wurde als durch DC von gesunden Individuen oder Zöliakie-Patienten unter Diät [83].

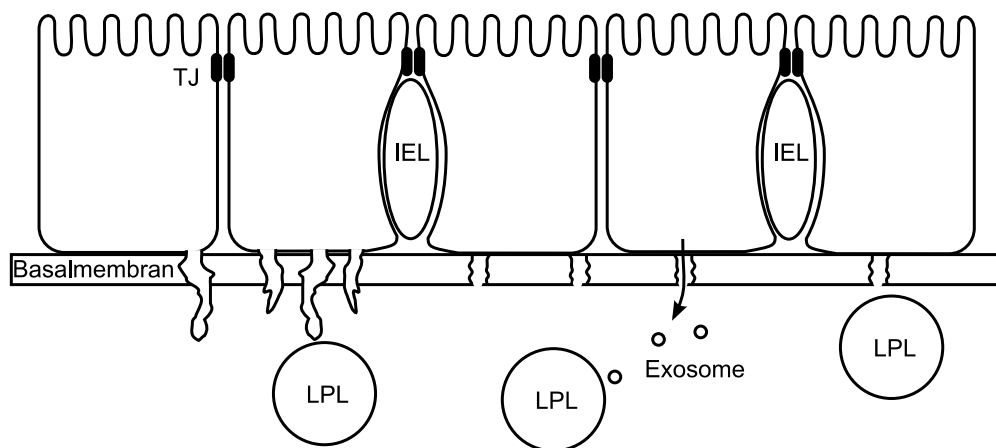
### 1.5.3 Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem

Eine adaptive Immunantwort wird durch APZ initiiert, primär durch DC, aber auch durch Makrophagen und B-Zellen. Diese präsentieren mittels MHC-Klasse-II-Molekülen antigene Fragmente an T-Zellen. APZ bewegen sich vom peripheren Gewebe zu den Lymphknoten, wo sie Effektor- oder tolerogene T-Zellen ausbilden, die in peripheren Geweben wirken. Die Reaktivierung von Effektor- und tolerogenen T-Zellen im peripheren Gewebe erfordert erneut die Interaktion mit APZ [67].

Um eine adaptive Immunantwort bei Zöliakie auszulösen, werden Proteinfragmente von APZ durch HLA-DQ2 und -DQ8-Moleküle gebunden und an deren Oberfläche präsentiert. Diese können von einer spezifischen Population CD4<sup>+</sup> T-Zellen erkannt werden. Dabei wird die Expression von HLA-DQ durch Zytokine, vornehmlich durch IFN- $\gamma$ , beeinflusst. Es wurde gezeigt, dass für eine optimale Bindung an HLA-DQ2 bzw. -DQ8 für viele Peptide eine Deamidierung durch tTG nötig ist. Die durch die Deamidierung eingebrachten negativen Ladungen an spezifischen Positionen der Gliadinpeptide begünstigen deren Interaktion mit den basischen Aminosäuren, die in der Bindungsposition von HLA-DQ2- / -DQ8-Molekülen lokalisiert sind. Dadurch kommt es zu einer stärkeren Peptidbindung und daraus folgend zu einer erhöhten T-Zell-Stimulation, wodurch wiederum zytotoxische T-Zellen, Makrophagen, Stromazellen und B-Zellen durch Sekretion eines bestimmten Zytokinmusters und Matrix-Metalloproteinasen aktiviert werden. Dies führt zur Produktion von Antikörpern und Gewebeschäden [29].

## 1.6 Enterozyten als antigenpräsentierende Zellen

Neben ihrer Funktion im Transport und der Prozessierung von luminalen Antigenen wird Enterozyten auch eine Rolle als APZ zugesprochen, die T-Zell-Antworten in der intestinalen Mukosa regulieren. Innerhalb des epithelialen Verbunds sind intestinale Epithelzellen im direkten Kontakt mit T-Zellen, den IEL. Eine unmittelbare Interaktion von Enterozyten mit *Lamina propria* T-Zellen *in vivo* wird kontrovers diskutiert, da ein direkter Kontakt durch die Basalmembran begrenzt wird. Als eine Hypothese zur direkten Interaktion gelten die Projektionen von intestinalen Epithelzellen, die durch vorhandene Poren die Basalmembran überwinden können. Des Weiteren wird eine Interaktion mit Immunzellen über die Freisetzung von Exosomen diskutiert, auf denen Antigene über MHC-Moleküle gebunden sein können (Abb. 1-15) [58,85].



**Abb. 1-15: Kontakt intestinaler Epithelzellen mit T-Zellen in der intestinalen Mukosa.** Intestinale Epithelzellen sind in Kontakt mit IEL und *Lamina propria* Lymphozyten (LPL). Durch Poren in der Basalmembran können IEC basolaterale Projektionen in die *Lamina propria* ausbilden, um mit dort lokalisierten Immunzellen zu interagieren. Adaptiert nach [85].

Der tatsächliche Anteil von Enterozyten an der Induktion von T-Zellen ist bisweilen noch nicht genau belegt. Entsprechend Abb. 1-16 existieren Hypothesen für die Interaktion mit T-Zellen und die daraus abgeleiteten Einflüsse.

Als Voraussetzung für eine Interaktion mit  $CD4^+$  T-Zellen exprimieren intestinale Epithelzellen konstitutiv MHC-Klasse-II-Moleküle, welche bei inflammatorischen Zuständen hochreguliert werden können. Extrazelluläre Antigene können durch Enterozyten prozessiert und über MHC-Klasse-II-Moleküle präsentiert werden. Dabei ist die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen hauptsächlich auf die basolaterale Membran beschränkt, wodurch eine Interaktion mit T-Zellen ermöglicht wird.

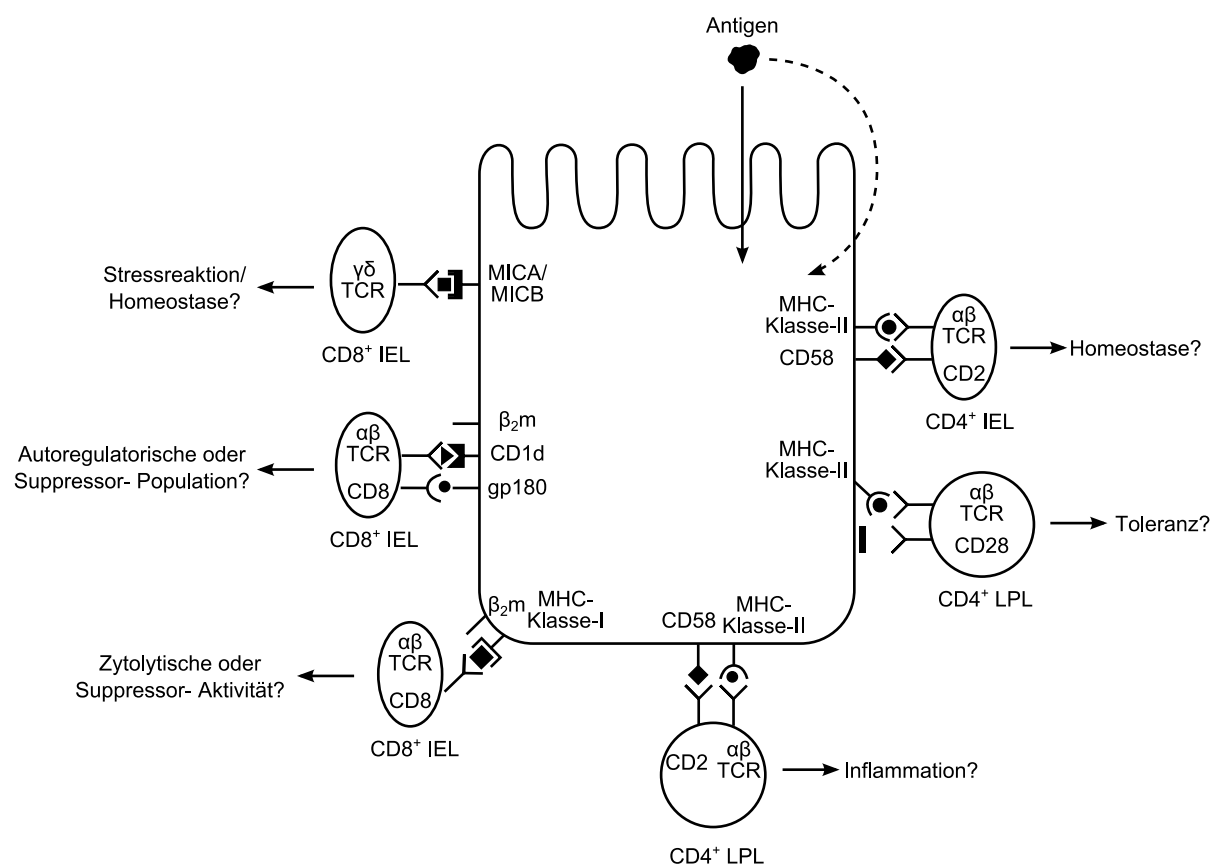
Durch den Einfluss von Oberflächenrezeptoren wird eine erhöhte Aufnahme spezifischer Antigene induziert. Auch kann dadurch der Transport in bestimmte Kompartimente bewirkt werden. In polarisierten Enterozyten kann zudem die apikale von der basolateralen Antigenaufnahme unterschieden werden. Es wird vermutet, dass durch die unterschiedliche Aufnahme Antigene auf ihrem Weg zu MHC-Klasse-II-positiven Endosomen auch selektiv spezifischen Proteasen ausgesetzt werden können. Dadurch kann die Erzeugung von T-Zell-Epitopen beeinflusst werden, was wiederum zu einer unterschiedlichen Interaktion mit T-Zellen führen kann [86,41,87–91]. Hershberg et al. [85,86] vermuten, dass die Prozessierung luminaler Antigene, die die epitheliale Barriere überwunden haben und dadurch statt apikal basolateral aufgenommen werden, evtl. einen anderen immunologischen Effekt hat. Aufgrund dessen könnte sich eine Immuntoleranz gegenüber einem Antigen in eine inflammatorische Antwort wandeln.

Es bestehen Hinweise darauf, dass Enterozyten unter inflammatorischen Einflüssen als APZ agieren und eine mukosale Immunantwort stimulieren können. Durch Versuche mit Mäusen konnte gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  bei Enterozyten den Antigentransport in MHC-Klasse-II-positive späte Endosome initiieren kann, was für eine verstärkte Antigenpräsentation sprechen würde [92]. Auch gibt es Hinweise darauf, dass, in Abhängigkeit einer mukosalen Entzündung, in Enterozyten zwei verschiedene Wege für eine MHC-Klasse-II-vermittelte Antigenprozessierung existieren und daraus unterschiedliche immunmodulatorische Eigenschaften hervorgehen. Durch den Einfluss von IFN- $\gamma$  erfolgt in Enterozyten eine effizientere Prozessierung und Präsentation auch bei geringer Antigenkonzentration. Hingegen wird für eine Präsentation ohne IFN- $\gamma$  eine höhere Konzentration an Antigenen benötigt [87,92,93].

Im Gegensatz zu APZ exprimieren Enterozyten nicht die kostimulatorischen Moleküle CD80 oder CD86, die für eine antigenspezifische Aktivierung von T-Zellen benötigt werden. Eine Antigenpräsentation ohne diese kostimulatorischen Moleküle führt zu einer Anergie und folglich zu einer Toleranz, weshalb Enterozyten unter normalen Bedingungen an einer Herunterregulierung der T-Zell-Antwort beteiligt sein könnten. Eine Immunantwort auf Antigene, welche die epitheliale Barriere überwunden und durch APZ präsentiert werden, könnte dadurch eingedämmt werden. Allerdings exprimieren humane Enterozyten konstitutiv CD58, ein Zelladhäsionsmolekül, das

mit CD2 interagiert, welches auf LPL exprimiert wird. Dies resultiert in einem starken Anstieg der Proliferation und Zytokinsekretion der T-Zellen [41,87].

Intestinale Epithelzellen sind auch positiv für MHC-Klasse-I bzw. MHC-Klasse-I-ähnliche Moleküle und dadurch fähig,  $CD8^+$  T-Zellen zu induzieren. Zu den durch Enterozyten exprimierten MHC-Klasse-I-ähnlichen Molekülen zählen HLA-E, CD1d, MICA und MICB. Durch MHC-Klasse-I-Moleküle können Antigene zytosolischen und nukleären Ursprungs auf der Zelloberfläche präsentiert werden. Auch scheint eine Präsentation von extrazellulären Antigenen wie bei MHC-Klasse-II-Molekülen möglich zu sein, was als Kreuzpräsentation beschrieben wird [57,94].



**Abb. 1-16: Hypothetisches Modell der Interaktion von intestinalen Epithelzellen und T-Zellen in der intestinalen Mukosa.** Adaptiert nach [85].

## 1.7 Orale Toleranz gegenüber Nahrungsantigenen

Als orale Toleranz wird der Zustand einer lokal und systemisch ausbleibenden Immunreaktion beschrieben, die durch orale Aufnahme von apathogenen Antigenen, wie Lebensmittelantigenen induziert wird. Durch eine fehlende mukosainduzierte Toleranz können intestinale Erkrankungen, wie Lebensmittelallergien, chronisch entzündliche Darmerkrankungen oder Zöliakie, ausgelöst werden [95].



Da das intestinale Immunsystem einer großen Anzahl an Fremdanthigenen ausgesetzt ist, muss nach der Pathogenität der Antigene unterschieden werden.

Zur Toleranzinduktion gegenüber ungefährlichen Antigenen existieren viele Mechanismen. Entscheidend ist dafür auch die verabreichte Dosis eines Antigens. Bei einer hohen Menge kommt es eher zur Induktion einer Anergie und der Apoptose von Antigen-reaktiven T-Zellen (Deletion). Bei einer geringen Dosis werden dagegen eher regulatorische T-Zellen ( $T_{reg}$ ) induziert. Die Induktion von  $T_{reg}$  zählt dabei zu den Hauptmechanismen einer Toleranzvermittlung.  $T_{reg}$  gehören zu den  $CD4^+$  T-Zellen, machen aber nur einen geringen Teil (ca. 5 %) der Gesamtpopulation von diesen aus. Sie haben die Fähigkeit, andere T-Zellen dahingehend zu beeinflussen, dass diese keine exzessive proinflammatorische Immunantwort auslösen.  $T_{reg}$  umfassen verschiedene phänotypisch ähnliche Zellen. Neben  $CD4^+$  T-Zellen wurden aber auch  $CD8^+$  T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften beschrieben. Dabei scheinen oral aufgenommene Antigene zur Induktion aller Arten von T-Zellen mit regulatorischen Eigenschaften fähig zu sein.

Die Vermittlung tolerogener Effekte durch die Induktion von  $T_{reg}$  konnte für bestimmte Typen dendritischer Zellen ( $CD103^+$ ) gezeigt werden [96,97]. Daneben tragen auch intestinale Epithelzellen zur Toleranzinduktion bei. Neben der Sekretion von TGF- $\beta$  und IL-10 beeinflussen sie  $CD103^+$  DC auch durch das Zytokin TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*), wodurch diese vermehrt antiinflammatorische Zytokine produzieren und mit  $T_{reg}$  interagieren. Auch kommt es bei der Präsentation von Antigenen durch Enterozyten durch das Fehlen von kostimulatorischen Molekülen zur Anergie. Des Weiteren scheinen Antigene mittels Exosomen von Enterozyten zu DC transportiert zu werden, wo diese einen tolerogenen Effekt durch vermehrte Expression von TGF- $\beta$  und folgender Induktion von  $T_{reg}$  erzielen [98,99].

## 2 Zielsetzung

Zöliakie ist eine multisystemische entzündliche Erkrankung die vornehmlich im Intestinaltrakt auftritt und durch den Verzehr von Proteinen aus verschiedenen Getreidesorten wie Weizen, Roggen, Gerste, Hafer, Dinkel, Kamut und Triticale ausgelöst wird. Ausschlaggebend für die Manifestation der Erkrankung ist eine fehlende Immuntoleranz gegenüber dem in diesen Getreidesorten vorkommenden Klebereiweiß Gluten [2,25].

Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht abschließend geklärt, auf welchem Weg die immunogenen und toxischen Bestandteile des Glutens die epitheliale Barriere überwinden, um mit dem Immunsystem zu interagieren. Es wird vermutet, dass aus Gluten abgeleitete Gliadinpeptide auch über den transzellulären Transport in Enterozyten Zugang zum intestinalen Immunsystem erlangen. Gegenüber dem Abbau durch intestinale Peptidasen wurden viele Gliadinpeptide als resistent bezeichnet [71,100].

Daher sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden, ob das toxische Gliadinpeptid P31-43 und immunogene Gliadinpeptid P56-68 in der Lage sind, eine intakte epitheliale Barriere zu passieren. Hierbei sollte auch eine mögliche Degradation der Peptide untersucht werden, da die eingesetzten kurzkettigen Peptide als stabil gegenüber der intestinalen Verdauung gelten. Für therapeutische Ansätze, die die Aktivierung einer regulatorischen Immunantwort durch die Präsentation von toxischen Gliadinpeptiden über Enterozyten fokussieren [123], wäre neben der Veränderung der endosomalen Transportroute der Erhalt der Peptidsequenz eine Voraussetzung.

Nach Überwindung der epithelialen Barriere treffen Antigene zunächst auf Zellen wie Makrophagen, Monozyten und DC. Als Schnittstelle zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem liegen DC im Fokus für die Induktion einer Immunantwort. In einigen Studien konnte ein Einfluss von Gliadin auf die Reifung von DC gezeigt werden. Welche spezifischen Gliadinpeptide für diese Effekte verantwortlich sind, konnte bisher nicht geklärt werden. Auch ob der Kontakt von Gliadinpeptiden mit Enterozyten zu einer Beeinflussung der DC-Reifung führt, war bisher ebenfalls noch nicht bekannt. Daher sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss von P31-43 und P56-68 auf die Reifung und Zytokinexpression durch DC untersucht werden. Daneben sollte auch getestet werden, ob Gliadinpeptide durch

ihren Einfluss auf eine epitheliale Zellbarriere bzw. durch die erfolgte Transzytose die Reifung von DC beeinflussen können.

Neben den klassischen APZ sind auch Enterozyten als APZ Gegenstand der Forschung. Dabei wird im Allgemeinen eher die Vermittlung eines tolerogenen Effekts durch die enterozytäre Antigenpräsentation angenommen. Auch bei gesunden Individuen, die positiv für die Zöliakie-assoziierten genetischen Merkmale HLA-DQ2 oder –DQ8 sind, wird ein Einfluss der Enterozyten auf die Erhaltung der Immuntoleranz diskutiert. In diesem Zusammenhang stellt sich die Frage, ob Enterozyten zur Präsentation von Gliadinpeptiden fähig sind und welche Auswirkung eine Antigenpräsentation durch Enterozyten auf die Proliferation von T-Zellen hat.

Zur Entwicklung von alternativen Behandlungsmöglichkeiten der Zöliakie ist ein besseres Verständnis der Erkrankung und der damit zusammenhängenden pathogenetischen Mechanismen nötig. Die Erkenntnisse aus dieser Arbeit sollen dazu beitragen, das Verständnis zum Pathomechanismus der Zöliakie zu erweitern.

### 3 Material

#### 3.1 Antikörper

##### Antikörper: Durchflusszytometrie

Antigen	Klon	Klonalität	Konjugat	Wirt	Reaktivität	Bezugsquelle
CD11c	B-ly6	IgG <sub>1</sub> , κ	PE	Maus	Human	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD14	M5E2	IgG <sub>2a</sub> , κ	FITC	Maus	Human, Rhesus, Cynomolgus, Pavian, Hund	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD19	4G7	IgG <sub>1</sub> , κ	PE	Maus		BD Biosciences, Heidelberg, D
CD1a	HI149	IgG <sub>1</sub> , κ	FITC	Maus	Human	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD3	SK7	IgG <sub>1</sub> , κ	FITC	Maus		BD Biosciences, Heidelberg, D
CD80	BB1	IgM, κ	FITC	Maus	Human	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD83	HB15e	IgG <sub>1</sub> , κ	APC	Maus	Human	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD83/ CD209/ CD86	HB15e/ DCN46/ 2331 (FUN-1)	IgG <sub>1</sub> , κ/ IgG <sub>2b</sub> , κ/ IgG <sub>1</sub> , κ	APC/ PerCP-Cy 5.5/ PE	Maus	Human	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD86	2331 (FUN-1)	IgG <sub>1</sub> , κ	PE	Maus	Human	BD Biosciences, Heidelberg, D
HLA-A2	BB7.2	IgG <sub>2b</sub> , κ	FITC	Maus	Human	BD Biosciences, Heidelberg, D
HLA-ABC	W6/32	IgG <sub>2a</sub> , κ	FITC	Maus	Human	eBiosciences, Frankfurt, D
HLA-DQ	1a3	IgG <sub>2a</sub> , κ	PE	Maus	Human	Leinco Technologies, Missouri, USA
HLA-DR	G46-6	IgG <sub>2a</sub> , κ	PerCP-Cy 5.5	Maus	Human	BD Biosciences, Heidelberg, D
HLA-DR	G46-6	IgG <sub>2a</sub> , κ	PE	Maus	Human	BD Biosciences, Heidelberg, D
IgG <sub>1</sub> / IgG <sub>1</sub> -Isotyp Kontrolle	X40/ X40	IgG <sub>1</sub> , κ/ IgG <sub>1</sub> , κ	PE/ FITC	Maus		BD Biosciences, Heidelberg, D
IgG <sub>2a</sub> - Isotyp Kontrolle	X39	IgG <sub>2a</sub> , κ	FITC	Maus	Human	BD Biosciences, Heidelberg, D

**Antikörper: Magnetic Activated Cell Sorting (MACS)**

Antigen	Klon	Klonalität	Konjugat	Wirt	Reaktivität	Hersteller
CD14	Mono- klonal	IgG <sub>2a</sub>	Magne- tische Beads	Maus	Human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

**3.2 Chemikalien und Reagenzien**

2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) ≥ 99,5 %	Sigma-Aldrich, München, D
Biocoll-Trennlösung	Biochrom, Berlin, D
bovines Serumalbumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, D
Cryo-safe-I	C.C.Pro, Oberdorla, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München, D
<i>Dulbecco's modified eagle medium</i> (DMEM)	Invitrogen, Darmstadt, D
Ethanol, 99,6 %, vergällt	Stockmeier Chemie, Dillenburg, D
Ethylendiamintetraacetat (EDTA) Dinatriumsalz Dihydrat	Sigma-Aldrich, München, D
FACS <i>Clean</i>	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACS <i>Flow Sheath fluid</i>	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACS <i>Rinse</i>	BD Biosciences, Heidelberg, D
fetales Kälberserum (FKS)	Invitrogen, Darmstadt, D
<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i> (GM-CSF)	PeproTech, Hamburg, D
Guava <i>Check Beads</i>	Merck Millipore, Darmstadt, D
Guava <i>Cleaning Fluid</i>	Merck Millipore, Darmstadt, D
<i>Hank's balanced salt solution</i> (HBSS) + Glukose	Invitrogen, Darmstadt, D
Höchst 33342	Invitrogen, Darmstadt, D
humanes Serum (HS)	PAA, Cölbe, D
Ibidi <i>Mounting Medium</i>	Ibidi, München, D
Interferon-γ (IFN-γ)	Sigma-Aldrich, München, D
<i>Iscove's modified Dulbecco's medium</i> (IMDM) (ohne Glutamin)	Lonza, Basel, CH

---

L-Glutamin	Invitrogen, Darmstadt, D
Lipopolysaccharide (LPS) von <i>Escherichia coli</i>	Sigma-Aldrich, München, D
MACS <i>Rinsing Solution</i>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD)	Sigma-Aldrich, München, D
Mitomycin C	Sigma-Aldrich, München, D
Nagellack (transparent)	Cosnova, Sulzbach, D
Natriumbicarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich, München, D
Natriumpyruvat (100 nmol/L)	Invitrogen, Darmstadt, D
Natronlauge (NaOH) (1 N)	Merck, Darmstadt, D
nicht-essentielle Aminosäuren ( <i>non-essential amino acids</i> , NEAA) (100x)	Invitrogen, Darmstadt, D
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, München, D,
Penicillin-Streptomycin (10.000 U/mL)	Invitrogen, Darmstadt, D
<i>phosphate-buffered saline</i> (PBS) (10x)	Invitrogen, Darmstadt, D
Prolong Gold	Invitrogen, Darmstadt, D
gereinigtes Phytohämagglutinin ( <i>purified phytohemagglutinin</i> , PHA)	Remel Europe Ltd., Rüsselsheim, D
rekombinantes humanes Interleukin 4 (rhIL-4)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
rekombinantes humanes Interleukin 15 (rhIL-15)	PeproTech, Hamburg, D
rekombinantes humanes Interleukin 2 (rhIL-2)	PeproTech, Hamburg, D
<i>Roswell Park Memorial Institute</i> (RPMI) 1640:	
	Gibco, Invitrogen, Darmstadt, D
	PAA, Cölbe, D
Salzsäure (HCl) (1 N)	Merck, Darmstadt, D
Szintillationsflüssigkeit ( <i>Betaplate Scint</i> )	Perkin Elmer, Groningen, NL
Thymidin [Methyl- <sup>3</sup> H]	Perkin Elmer, Groningen, NL
Trypanblau	Invitrogen, Darmstadt, D
Trypsin (0,05 %) / EDTA (0,481 mmol/L)	Invitrogen, Darmstadt, D

<i>trypsin-like enzyme</i> (TrypLE Express)	Invitrogen, Darmstadt, D
Wasser (steril, pyrogenfrei)	B. Braun, Melsungen, D
Wasser (Chromasolv Plus) (Verwendung für ELISA)	Sigma-Aldrich, München, D

#### ELISA Kits:

Human CXCL8/IL-8 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden, D
Human TNF- $\alpha$ Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden, D
Human TGF- $\beta$ 1 Quantikine ELISA Kit	R&D Systems, Wiesbaden, D

### 3.3 Hergestellte Lösungen

1,2 N NaOH / 0,5 M HEPES	6 mL 2 N NaOH mit 4 mL H <sub>2</sub> O versetzen und darin 1,19 g HEPES lösen
3%ige Formaldehydlösung	4 g PFA in 50 mL H <sub>2</sub> O lösen, mit 1 N NaOH durch Titration klären; mit PBS auf 100 mL auffüllen; pH-Wert mit 1 N HCl auf 7,4 einstellen
70%iges Ethanol	70 % Ethanol (99,6 %) + 30 % H <sub>2</sub> O
FACS-Puffer	PBS + 0,5 % FKS
FKS hitzeinaktiviert	FKS bei 57 °C für 30 min hitzeinaktiviert
Höchst 33342 Stock	10 mg Höchst 33342 in 1 mL DMSO lösen
HS hitzeinaktiviert	HS bei 57 °C für 30 min hitzeinaktiviert
MACS Waschpuffer	MACS Rinsing Solution + 0,5 % BSA
PBS (1x)	10 % PBS (10x) + 90 % H <sub>2</sub> O
Trypsin (0,05 %) / EDTA (2,4 mmol/L)	Trypsin (0,05 %) / EDTA (0,481 mmol/L) + 1,9 mmol/L Na <sub>2</sub> -EDTA

### 3.4 Zelllinien

#### HT-29-Zellen

ATCC Nummer: HTB-38 (*American Type Culture Collection* (ATCC), Manassas, USA)

DSMZ Nummer: ACC 299 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, D)

(Die verwendeten HT-29-Zelllinien sind identisch)

#### Caco-2-Zellen

ATCC Nummer: HTB-37 (*American Type Culture Collection* (ATCC), Manassas, USA)

### 3.5 Medien

HT-29-Kulturmedium	RPMI 1640 + 10 % FKS
Caco-2-Kulturmedium	DMEM + 10 % FKS + 1 % Pyruvat + 1 % NEAA
Caco-2-Kulturmedium (20 % FKS)	DMEM + 20 % FKS + 1 % Pyruvat + 1 % NEAA + 1 % PenStrep
Monozyten-Kulturmedium	RPMI 1640 + 10 % HS
iDC-Inkubationsmedium	RPMI 1640 + 2 % HS
iDC-Differenzierungsmedium	RPMI 1640 + 10 % HS + 1000 U/mL GM-CFS + 500 U/mL IL-4
T-Zell-Kulturmedium	IMDM (ohne Glutamin) + 1 % Glutamin + 10 % HS
T-Zell-Stimulationsmedium	IMDM (ohne Glutamin) + 1 % Glutamin + 10 % HS + 20 U/mL IL-2 + 10 ng/mL IL-15

### 3.6 Verbrauchsmaterialien

Chamber Slides (8-Well)	Ibidi, München, D
Deckgläschen, rund (Ø 12 mm)	Roth, Karlsruhe, D
Einmalhandschuhe	NOBA, Wetter, D
Einmal-Reaktionsgefäße:	
200, 500, 1500, 2000 µL	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
200, 500, 1500, 2000 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Einwegskalpell	Roth, Karlsruhe, D
FACS-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, D



---

Fiberglasfilter (Printed Filtermat A)	Perkin Elmer, Groningen, NL
Fusselfreie Tücher	Kimberly-Clark, Koblenz-Rheinhafen, D
Immersionsöl	Nikon, Düsseldorf, D
Kryo-Röhrchen:	
Cryo.s Einfrierröhrchen 2 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen,
Nunc CryoTube Vials 2 mL	Sigma-Aldrich, München, D
MACS-Säulen (MS) + Filter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Objektträger	Roth, Karlsruhe, D
Pasteur-Pipetten, lang	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D
Pipettenspitzen:	
200, 1000 µL	Sarstedt, Nümbrecht, D
10, 100, 200, 1000 µL	Biozym, Hessisch Oldendorf, D
Filterspitzen	
10, 100, 200, 1000 µL	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Filterspitzen	
10, 100, 200, 1000 µL	Nerbe-Plus, Winsen, D
Filterspitzen	
10, 100, 200, 1000 µL	Corning (Axygen), Wiesbaden, D
Filterspitzen	
100 µL gestopft	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
10, 200, 1000 µL	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
10, 200, 1000 µL	Gilson, Limburg-Offheim, D
Plastik-Pasteur-Pipetten (3 mL)	BD Biosciences, Heidelberg, D
Probentaschen für Fieberglasfilter	Perkin Elmer, Groningen, NL
Serologische Pipetten:	
Corning Costar Stripette 2, 5, 10, 25 mL	Sigma-Aldrich, München, D
2 mL	BD Biosciences, Heidelberg, D
5, 10, 25 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
Spritzen:	
5 mL	BD Biosciences, Heidelberg, D
2, 5 mL	B. Braun, Melsungen, D
Spritzenaufsatz für Multihubpipette	Brand, Wertheim, D

## Spritzenvorsatzfilter:

Ø 3 mm, Porengröße 0,22 µm	Roth, Karlsruhe, D
Ø 15 mm, Porengröße 0,2 µm	Roth, Karlsruhe, D
Ø 30 mm, Porengröße 0,2 µm	VWR, Darmstadt, D

Thincert Zellkultureinsätze (für  
24-Well, transparente Membran,  
Kulturfläche: 33,6 mm², 0,4 µm  
Porendurchmesser

Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

Zellkulturflaschen (25, 75 cm²)

Greiner Bio-One, Frickenhausen, D

## Zellkulturplatten:

6-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
24-Well	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
96-Well	Sigma-Aldrich, München, D

## Zellschaber:

Greiner Bio-One, Frickenhausen, D  
Sarstedt, Nümbrecht, D

## Zentrifugenröhrchen:

15, 50 mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen, D
50 mL	BD Biosciences, Heidelberg, D

### 3.7 Geräte

Absauggerät (VacuSafe  
Comfort)

IBS Interga Biosciences, Fernwald, D

## Analysewaagen:

Explorer Pro	Ohaus, Nänikon, CH
Mettler H542	Mettler Toledo, Gießen, D
Sartorius R300S	Sartorius, Göttingen, D

Becherglas (200 mL)

Schott, Mainz, D

Bestrahlungsgerät (Gammacell  
1000 Elite)

MDS Nordion, Kanata, CDN

## Brutschänke:

Heraeus BBD 6220	Thermo Scientific, Langenselbold, D
HeraSafe	Thermo Scientific, Langenselbold, D
NAPCO 6000	Thermo Scientific, Langenselbold, D
Sanyo MCO-18AIC(UV)	EWALD Innovationstechnik, Bad Nenndorf, D

## Durchflussszytometer:

FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, D
Guava easyCyte mini	Merck Millipore, Darmstadt, D

## Einschweißgerät (Heat sealer)

Perkin Elmer, Groningen, NL

## ELISA-Reader DigiScan 400

Asys Hitech, Eugendorf, AU

## Hämozytometer (Zählkammer nach Neubauer)

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D

## Harvester

Tomtec, Hamden, USA

## Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop (Nikon Eclipse TE2000-E)

Nikon, Düsseldorf, D

## Beleuchtungssystem (EXFO X-Cite 120)

Nikon, Düsseldorf, D

CO<sub>2</sub>-Controller

Pecon, Erbach, D

## Kamera (DS-L1)

Nikon, Düsseldorf, D

## Konfokalcomputer (D-Eclipse C1)

Nikon, Düsseldorf, D

## Laser 405 (Radius)

Coherent, Dieburg, D

## Laser 488

CVI Melles Griot, Bensheim; D

## Laser 543

CVI Melles Griot, Bensheim; D

## Laser Gestell (C-LU3)

Nikon, Düsseldorf, D

## Objektive:

## 60x Plan Apo

Nikon, Düsseldorf, D

## 100x Apo TIRF

Nikon, Düsseldorf, D

## Perfect Focus (T-PFC)

Nikon, Düsseldorf, D

## Scanning Tisch (ProScan II)

Prior, Jena, D

## Steuereinheit (T-RCP)

Nikon, Düsseldorf, D

## Temperaturregler

Solent Scientific, Segensworth, GB

## Laminar Flow Werkbänke:

EuroFlow EF

Clean Air

HeraSafe

Thermo Scientific, Langenselbold, D

## Lichtmikroskope:

Zeiss AxioStar plus

Zeiss, Wetzlar, D

Zeiss Axiovert 25

Zeiss, Wetzlar, D

## Lyophilisator (Christ alpha 1-4)

Martin Christ, Osterode, D

## MACS Separator

Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

## Magnetrührgerät

Thermo Scientific, Langenselbold, D

## Mikropipetten:

0,1-0,25 µL, 0,5-10 µL,  
10-100 µL, 100-1000 µL

Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D

100-1000 µL

Gilson, Limburg-Offheim, D

Mikrotiterplatten-Fluorometer  
(Fluoroskan Ascent FL)

Thermo Scientific, Langenselbold, D

## Multihubpipette

Brand, Wertheim, D

## Multikanalpipette

Merck, Darmstadt, D

## pH-Meter (Mettler FE20)

Mettler Toledo, Gießen, D

## Pipettierhilfen:

Matrix CellMate II

Thermo Scientific, Langenselbold, D

Pipetboy

Integra Biosciences, Fernwald, D

Pipetus

Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, D

## Plattenschüttler:

NeoLab Shaker DTS-2

NeoLab, Heidelberg, D

VM4 CAT

MAGV, Rabenau-Londorf, D

## Vakuumpumpe für Lyophylle

Pfeiffer Vacuum, Aßlar, D

## Volt-Ohm Meter (Millicell-ERS)

Millipore, Schwalbach, D

## Vortex Mixer:

MS2 Minishaker

IKA, Staufen, D

Vortex Mixer

Gemmy Industrial, Düsseldorf, D

## Wasserbad (Julabo 5b)

Julabo, Seelbach, D

---

**Zentrifugen:**

Mikro 22	Hettich, Tuttlingen, D
Minispin	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf, D
Rotina 38	Hettich, Tuttlingen, D
Rotina 420R	Hettich, Tuttlingen, D

---

**3.8 Bioinformatische Programme**

---

Ascent Software 2.6	Thermo Scientific, Vantaa, FIN
CellQuest Pro 6.0	BD Biosciences, Heidelberg, D
CytoSoft 4.2.1	Guavatechnologies, Hayward, USA
EZ-C1 3.80	Nikon, Amstelveen, NL
FlowJo vX0.6	Tree Star, Ashland, USA
Graph Pad Prism 4.03 und 6.04	GraphPad Software, Lajolla, USA
ImageJ 1.47t	National Institutes of Health, Bethesda, USA
MikroWin 2000	Mikrotek Laborsysteme, Overath, D
NIS Elements 3.0	Nikon, Amstelveen, NL

---

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Beschreibung der verwendeten intestinalen Zelllinien

##### 4.1.1.1 HT-29-Zellen

Die Zelllinie HT-29 wurde ursprünglich 1964 von J. Fogh und G. Trempe aus einem Kolonkarzinom einer 44 Jahre alten kaukasischen Frau isoliert. Bei Wachstum in Glukose-reichem Medium liegen HT-29-Zellen in undifferenzierter Form vor. Morphologisch wachsen sie dadurch als Multilayer unpolarisierter Zellen [101–104]. In der vorliegende Arbeit wurden die Klone HTB-38 (ATCC) bzw. ACC 299 (DSMZ) verwendet, welche identisch sind. Die Zellen wurden in undifferenzierter Form eingesetzt.

##### 4.1.1.2 Caco-2-Zellen

Die Zelllinie Caco-2 entstammt einem Kolonkarzinom eines 72-jährigen kaukasischen Mannes. In der vorliegenden Arbeit wurde der Klon HTB-37 (ATCC) verwendet. In nicht-konfluenter Form besitzen Caco-2-Zellen, gemessen an der Aktivität der Alkalischen Phosphatase, einen geringen Differenzierungsgrad. Nach Erreichen der Konfluenz beginnen die Zellen spontan zu differenzieren, was von einer steigenden Aktivität der Alkalischen Phosphatase begleitet wird. Nach ungefähr 14-tägiger Konfluenz entsprechen diese phänotypisch reifen Epithelzellen [105–107]. Neben der Ausbildung von apikal lokalisierten Mikrovilli entstehen zwischen angrenzenden Zellen *Tight Junctions*. Elektrische Messungen zeigen, dass Monolayer von polarisierten Caco-2-Zellen einen Widerstand aufbauen [108,109]. Die Kultur von konfluenten Caco-2-Zellen auf permeablen Filtern führt dabei zu einer verbesserten morphologischen und funktionalen Differenzierung und wird als physiologisches Modell für intestinale Transportstudien genutzt [105].

#### 4.1.2 Kultivierung der Zelllinien

Die Zelllinien HT-29 und Caco-2 wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre mit dem jeweiligen Kulturmedium

inkubiert. Die Arbeit mit den Zellen erfolgte keimfrei unter einer sterilen Werkbank (Laminar Flow) mit sterilem Arbeitsmaterial. Als Kulturgefäße dienten 75 cm<sup>2</sup> bzw. 25 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen.

#### **4.1.2.1 Wechsel des Kulturmediums**

Zur Gewährleistung einer kontinuierlichen Proliferation wurde in einem Abstand von zwei bis drei Tagen das Medium gewechselt. Dies diente der Entfernung von Stoffwechselprodukten und der Zufuhr neuer Nährstoffe. Hierzu wurde das alte Kulturmedium abgesaugt und durch frisches, auf 37 °C erwärmtes, Medium ersetzt.

#### **4.1.2.2 Passagieren der Zellen**

Bevor die Zellen von der Proliferations- in die Differenzierungsphase übergehen, wurde bei einer Zellkonfluenz von ca. 80 % eine Subkultur angelegt. Hierfür wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen durch Zugabe von ca. 5 mL (bzw. ca. 3 mL bei 25 cm<sup>2</sup> Flaschen) *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) unter Schwenken gewaschen. Nach Überschichtung mit 2 mL TrypLE Lösung (bzw. 0,5 mL bei 25 cm<sup>2</sup> Flaschen) wurden die Zellen bei 37 °C 2 - 5 min inkubiert, um die Zell-Adhäsion an der Zellkulturflasche zu lösen. Nach dem Ablösen der Zellen wurden diese zum Stoppen der Trypsinierung mit 8 mL Kulturmedium gemischt und ein Aliquot mit frischem Kulturmedium neu ausgesät.

#### **4.1.2.3 Einfrieren von Zellen**

Zur Kryokonservierung der Zellen wurden diese in ein Zentrifugenröhrchen überführt und mit 300 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 1 mL Kulturmedium resuspendiert. Aus der Zellsuspension wurde mittels Trypanblau-Färbung und Hämozytometer (Zählkammer nach Neubauer) die Zellzahl pro Milliliter bestimmt (Abb. 4-1) und die gewünschte Zellzahl eingestellt (zwischen  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  Zellen/mL). Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in ihrem jeweiligen Kulturmedium mit 20 % Serum resuspendiert und auf Eis dieselbe Menge des jeweiligen Kulturmediums, 20 % Serum und 20 % DMSO zugegeben. Die Suspension wurde möglichst schnell in Kryo-Röhrchen überführt und bei -80 °C eingefroren und nach drei Tagen in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

Alternativ wurden Zellen auch mittels des kommerziell erhältlichen Einfriermediums Cryo-safe-I kryokonserviert. Hierbei wird nach der Zentrifugation der Zellen das Zellsediment auf Eis in Cryo-safe-I resuspendiert und eine Zelldichte von  $2 - 4 \times 10^6$  Zellen eingestellt. Nach Überführung in Kryo-Röhrchen wurde die Zellsuspension zuerst für 40 min bei  $-20\text{ °C}$  und dann für 1 h bei  $-80\text{ °C}$  eingefroren. Anschließend wurden die Kryo-Röhrchen in einen Behälter mit flüssigem Stickstoff überführt.

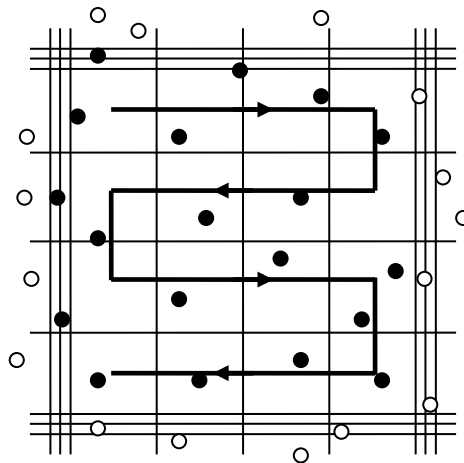
#### **4.1.2.4 Auftauen von Zellen**

Zum Auftauen der Zellen wurde aus dem Kulturmedium mit 50 % Serum ein Auftau-Mix erstellt. Für ein Kryo-Röhrchen eingefrorener Zellen wurde 2 mL Auftau-Mix in einem Zentrifugenröhrchen bereitgestellt. Die Zellen wurden im Wasserbad ( $37\text{ °C}$ ) unter Schwenken möglichst schnell aufgetaut. Der Inhalt des Kryo-Röhrchens wurde mit einer Plastik-Pasteurpipette durch langsames Mischen mit dem Auftau-Mix in das Zentrifugenröhrchen übertragen. Zum Waschen der Zellen wurden 10 mL RPMI zugefügt und die Suspension bei  $300 \times g$  10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet im gewünschten Medium resuspendiert und die darin enthaltenen Zellen mittels Trypanblau-Färbung und Hämozytometer gezählt.

#### **4.1.2.5 Ermittlung der Zellzahl**

Die Bestimmung der Zellzahl sowie die Überprüfung der Vitalität der Zellen erfolgten mittels Trypanblau-Färbung in einem Hämozytometer (Abb. 4-1). Hierfür wurde ein Aliquot der zu bestimmenden Zellsuspension mit Trypanblau versetzt. Der saure Farbstoff wird aufgrund seiner Größe ( $M = 960,8\text{ g/mol}$ ) nur von toten Zellen aufgenommen, deren Membran durchlässig geworden ist und gelangt auf diesem Weg ins Zytoplasma. Tote Zellen erscheinen dadurch tiefblau, während lebende Zellen als helle Objekte im Mikroskop sichtbar werden. Da der Azofarbstoff Trypanblau zytotoxisch wirkt, sollte eine zu lange Einwirkzeit vermieden werden und die mikroskopische Auswertung direkt nach Suspension mit Trypanblau erfolgen.





**Abb. 4-1: Auszählen der Zellen mithilfe eines Hämozytometers.** Alle schwarz gefüllten Zellen werden bei der Auszählung miteinbezogen.

Das zur Auszählung der Zellen verwendete Hämozytometer besteht aus einer flachen Glasplatte, die in der Mittelfläche eine definierte Vertiefung mit quadratischen Feldern von definierter Größe enthält, dem Zählnetz. Auf dieses wird durch Anfeuchten und leichtem Druck ein Deckglas montiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurde die in Trypanblau gelöste Zellsuspension zwischen Deckglas und Hämozytometer injiziert und entsprechend Abb. 4-1 vier große Quadrate mit jeweils 16 Einzelquadraten mäanderförmig ausgezählt. Aus der Zellzahl der vier Großquadrate wurde das arithmetische Mittel gebildet und die Zellzahl wie folgt berechnet:

$$\text{Gesamtzahl der Zellen / mL} = Z \cdot V \cdot K$$

wobei Z = arithmetisches Mittel der gezählten Zellen aus vier Großquadraten; V = Verdünnungsfaktor (Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau); K = Kammerfaktor (bei Neubauer Zählkammer  $10^4$ ); der Kammerfaktor, durch welchen sich die Zellzahl auf einen Milliliter beziehen lässt, ergibt sich aus dem resultierenden Volumen der Fläche eines Großquadrates ( $1 \text{ mm}^2$ ) und der Tiefe der Kammer ( $0,1 \text{ mm}$ ).

Anhand dieser Methodik wurde eine Suspension, die sich aus  $20 \mu\text{L}$  Zellsuspension und  $80 \mu\text{L}$  Trypanblau zusammensetzte, für die Zellzahlbestimmung verwendet.

## 4.2 Synthese von Peptiden

Zur Untersuchung des Einflusses von toxischen und immunogenen Gliadinpeptiden auf die Reifung dendritischer Zellen wurden die Gliadinpeptide P31-43 (LGQQQPFPPQQPY) und P56-68 (LQLQPFPQPQLPY) synthetisiert. Zur

Untersuchung des Transports von Gliadinpeptiden in Enterozyten wurden die Gliadinpeptide zusätzlich mit Fluoreszenzfarbstoffen (PromoFluor-488 (PF; PromoKine, Heidelberg; D) und Lissamin Rhodamin B (Liss; Acros Organics, Geel, B)) markiert. Die Synthese der Gliadinpeptide und die Kopplung dieser mit dem Fluoreszenzfarbstoff erfolgte durch Dr. Sevgi Arampatzi aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Maison am Institut für Organische Chemie in Gießen [107].

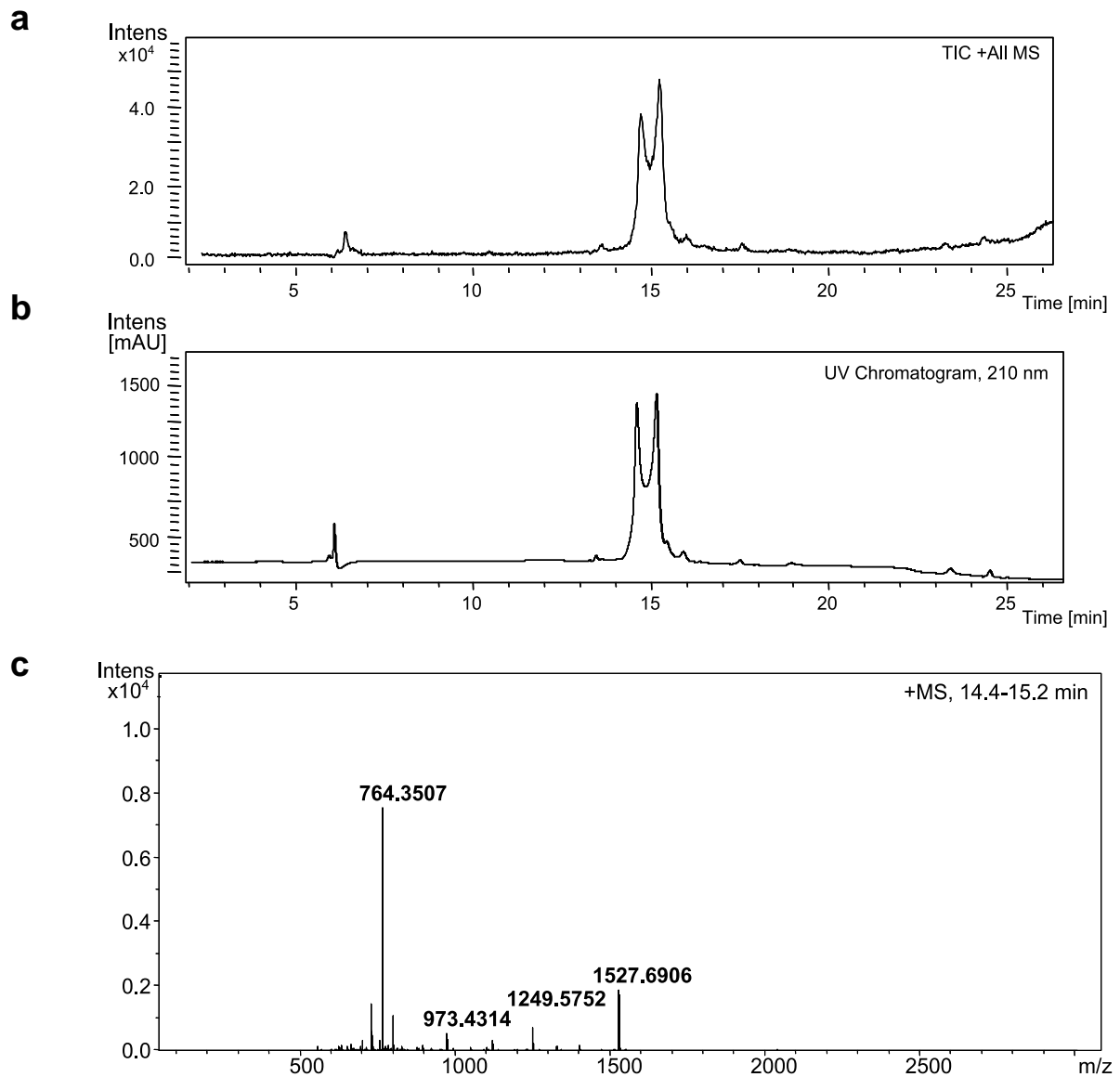
Zur Untersuchung der Proliferation von T-Zellen durch Interaktion mit intestinalen Zelllinien wurden das Gliadinpeptid Glia- $\alpha$ 9 (LQFPQPELPYPQ) und das in *Mycobacterium Tuberculosis* vorkommende Peptid 1113.47 (KTIAYDEEARRGL) eingesetzt. Diese Peptide wurden durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frits Koning (Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, NL) bereitgestellt und die Arbeiten im Rahmen eines Forschungsaufenthalts vor Ort durchgeführt.

#### 4.2.1 Darstellung von P31-43 und P56-68

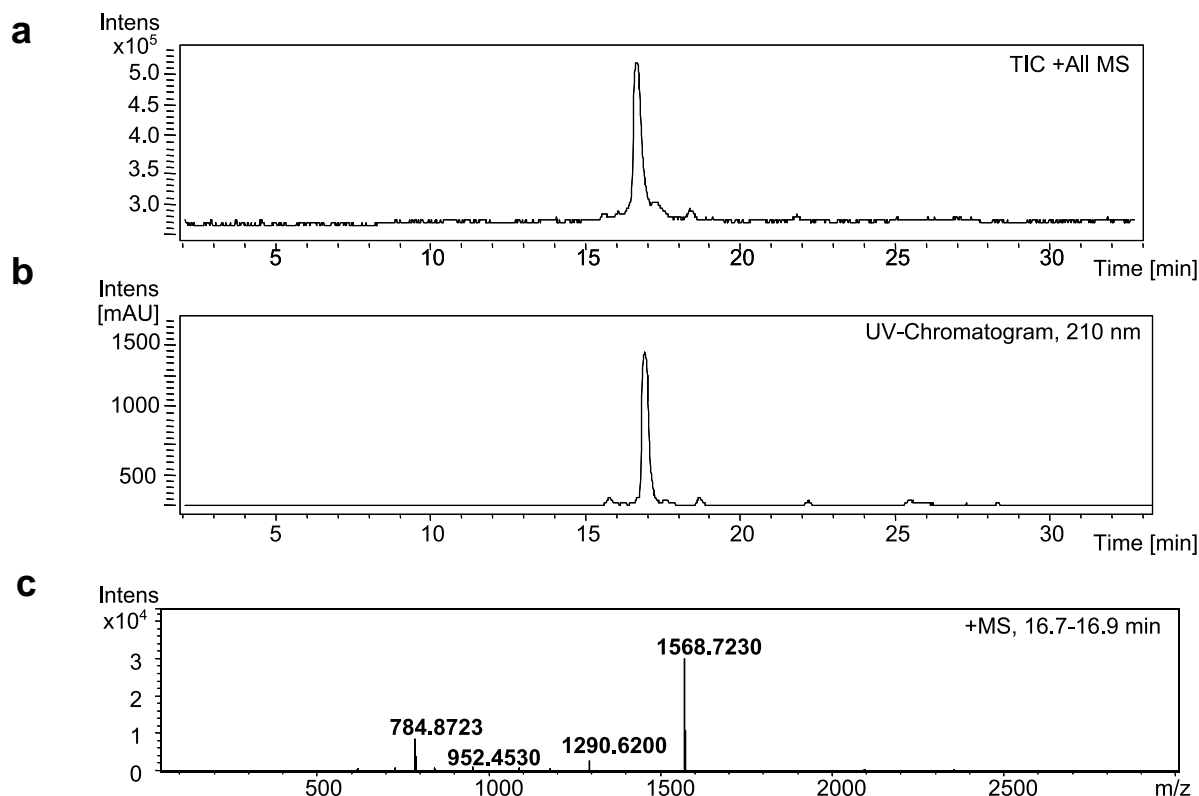
Die Synthese der Peptide erfolgte zum einen automatisiert mittels Peptidsynthesizer (Liberty 12; CEM, Kamp-Lintfort, D), zum anderen manuell mittels linearer Festphasensynthese (*solid phase peptide synthesis*, SPPS).

Die Darstellung von P31-43 und P56-68 mittels linearer SPPS wurde unter Verwendung eines Standardprotokolls [110] entsprechend der Fmoc/<sup>t</sup>Bu-Schutzgruppenstrategie an einem Fmoc-Tyr(<sup>t</sup>Bu)-Wang-Harz durchgeführt. Dabei wurde das Peptid an einer festen Phase, dem Polystyrol-Harz, das mit 1 - 2 % Divinylbenzol quervernetzt wurde, synthetisiert, wobei die Darstellung vom C- zum N-Terminus verlief. Die feste Phase wurde folglich mit einem säurelabilen sogenannten Wang-Linker (4-Benzyloxy-benzylalkohol) funktionalisiert, was als Wang-Harz bezeichnet wird. Als erster Syntheseschritt wurde eine Aminosäure mit der Carboxylgruppe am Wang-Linker gebunden. Die zur Darstellung der Peptide verwendeten Aminosäuren waren am N-terminalen Ende mit einer basenlabilen Fluorenyl-9-methyloxycarbonyl- (Fmoc)-Schutzgruppe versehen, die nach erfolgreicher Bindung der Aminosäure mittels Piperidin (25 % in *N,N*-Dimethylformamid (DMF)) entfernt wurde. An das freiliegende N-terminale Ende wurde die nächste Aminosäure (gelöst in DMF) gekoppelt und die Fmoc-Schutzgruppe entfernt. Dieser Prozess wurde so oft durchlaufen, bis die gewünschte

Sequenz vorlag. Um die Bindung von Aminosäuren an Seitenketten zu hindern, wurden vorhandene Seitenketten mit einer Schutzgruppe versehen (Glutamin: Trityl, Tyrosin: tert-Butyl (<sup>t</sup>Bu)). Zur Vorbeugung einer Racemisierung während der Kopplungsreaktion wurden außerdem Kopplungsreagenzien (2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumhexafluorophosphat (HBTU) / 1-Hydroxybenzotriazol (HOBt)) hinzugefügt. Da bei jeder Kopplung pro Äquivalent Aminosäure ein Äquivalent Säure frei wird, verringert sich der pH-Wert. Um dem sinkenden pH-Wert entgegenzuwirken, wurde die Base Diisopropylethylamin (DIPEA) hinzugefügt. Final erfolgte die Abspaltung des Wang-Linkers sowie der vorhandenen Seitenschutzgruppen mittels Trifluoressigsäure (TFA), was zur Freisetzung des Peptids führte. Um während der Abspaltung eine irreversible Alkylierung des Peptids zu verhindern, wurde Triisopropylsilan (TIS) als *Scavenger* hinzugefügt (Mischungsverhältnis: 95 % TFA, 2,5 % TIS, 2,5 % H<sub>2</sub>O). Nachfolgend wurden die Peptide durch den Einsatz von Umkehrphasen-Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (*reversed phase high-performance liquid chromatography*, HPLC/RP) (Merck-Hitachi Elite LaChrom, Merck, Darmstadt, D) mit einem MeCN-Gradienten (5 - 95 % über 15 min) in H<sub>2</sub>O aufgereinigt (Merck LiChrosorb RP-8 Säule (250 x 4,6 mm) (P31-43: Flussrate = 3 mL/min, Retentionszeit = 3,0 min; P56-68: Flussrate = 3 mL/min, Retentionszeit = 2,5 min)). Die Detektion erfolgte hierbei mittels Ultraviolettstrahlungs (UV) –Absorption. Das aufgereinigte Produkt wurde gefriergetrocknet und mittels Flüssigchromatographie mit massenspektrometrischer Detektion (*liquid chromatography–mass spectrometry*, LC-MS) als Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-MS) (MicroTOF, Bruker Daltonics, Bremen, D) identifiziert (P31-43: Flussrate = 0,2 mL/min; Retentionszeit = 15 min, P56-68: Flussrate = 0,2 mL/min; Retentionszeit = 17 min) (Abb. 4-2 und Abb. 4-3). Die Ausbeute von P31-43 entsprach 71 %, die Ausbeute von P56-68 lag bei 83 % [107].



**Abb. 4-2: LC-MS-Spektren von P31-43 (LGQQPFPPQQPY).** (a) Totalionenstrom (*total ion current*, TIC)-Spektrum; (b) UV-Chromatogramm bei 210 nm; (c) Massenspektrum einzelner Signale bei 14,4 – 15,2 min.  $[M+H]^+ = 1527,7$ ;  $[M+2H]^+ = 764,4$ .



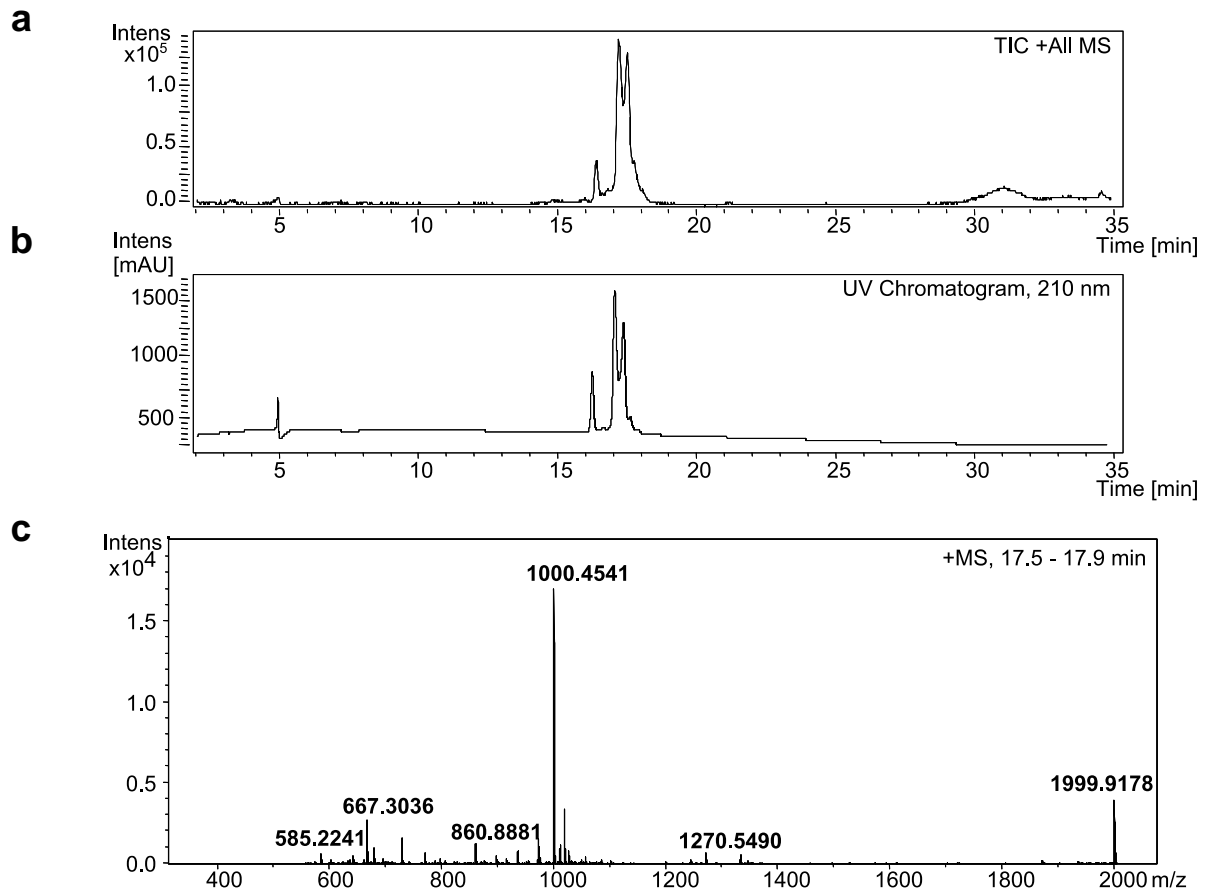
**Abb. 4-3: LC-MS-Spektren von P56-68 (LQLQFPQPQLPY).** (a) Totalionenstrom (*total ion current*, TIC)-Spektrum; (b) UV-Chromatogramm bei 210 nm; (c) Massenspektrum einzelner Signale bei 16,7 – 16,9 min.  $[M+H]^+ = 1568,7$ ;  $[M+2H]^+ = 784,9$ .

#### 4.2.2 Kopplung von P31-43 und P56-68 mit Fluoreszenzfarbstoff

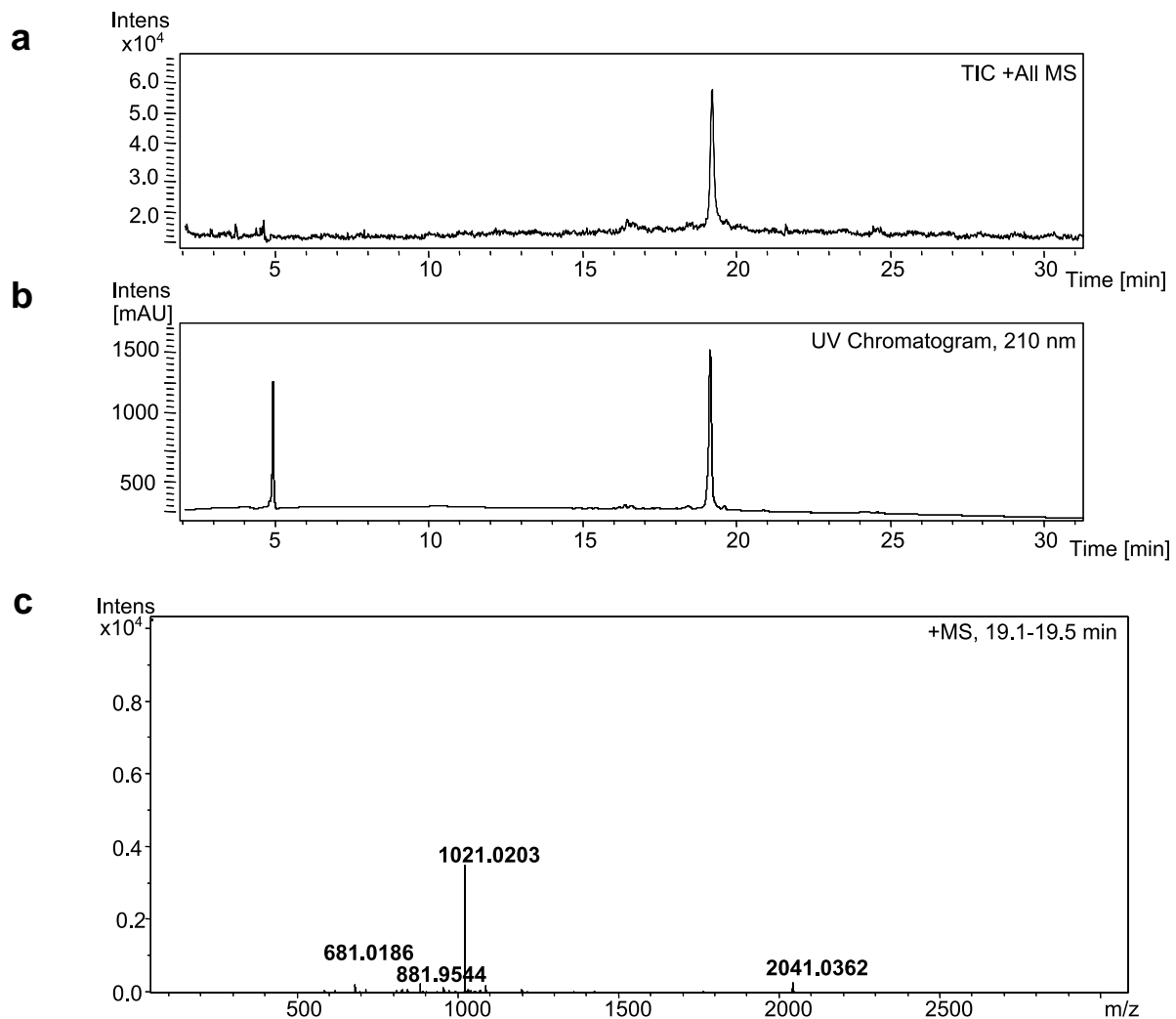
Die synthetisierten Peptide wurden teilweise mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert. Hierfür wurden die kommerziell erhältlichen Farbstoffe PF ( $\lambda_{\text{abs}} = 495 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) und Liss ( $\lambda_{\text{abs}} = 560 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 580 \text{ nm}$ ) gewählt.

PF ist mit einer Succinimidyl-Aktivester-Einheit versehen, durch welche eine selektive, stabile Bindung an der Aminogruppe der Peptide möglich ist. Das zu markierende Peptid wurde unter Stickstoff-Atmosphäre in DMSO gelöst und mit Triethylamin ( $\text{NEt}_3$ ) der pH-Wert auf etwa 8 eingestellt. Nach Kühlung auf  $0^\circ\text{C}$  wurde eine zum eingesetzten Peptid äquimolare Menge des Fluoreszenzfarbstoffs in DMSO zugegeben und 48 h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur gerührt. Nach Entfernung des Lösungsmittels unter Vakuum und anschließender Gefriertrocknung wurde das erhaltene Produkt mittels HPLC/RP gereinigt (PF-P31-43: RP-18 Säule, Flussrate =  $2 \text{ mL/min}$ , Retentionszeit =  $7,1 \text{ min}$ ; PF-P56-68: RP-8 Säule, Flussrate =  $2 \text{ mL/min}$ , Retentionszeit =  $2,4 \text{ min}$ ) und durch LC-MS identifiziert (PF-P31-43: Flussrate =  $0,2 \text{ mL/min}$ ; Retentionszeit =  $17 \text{ min}$ , PF-P56-68: Flussrate =  $0,2 \text{ mL/min}$ ;

Retentionszeit = 19 min) (Abb. 4-4 und Abb. 4-5). Die Ausbeute bei PF-P31-43 entsprach 51 %, die Ausbeute von PF-P56-68 betrug 46 %.



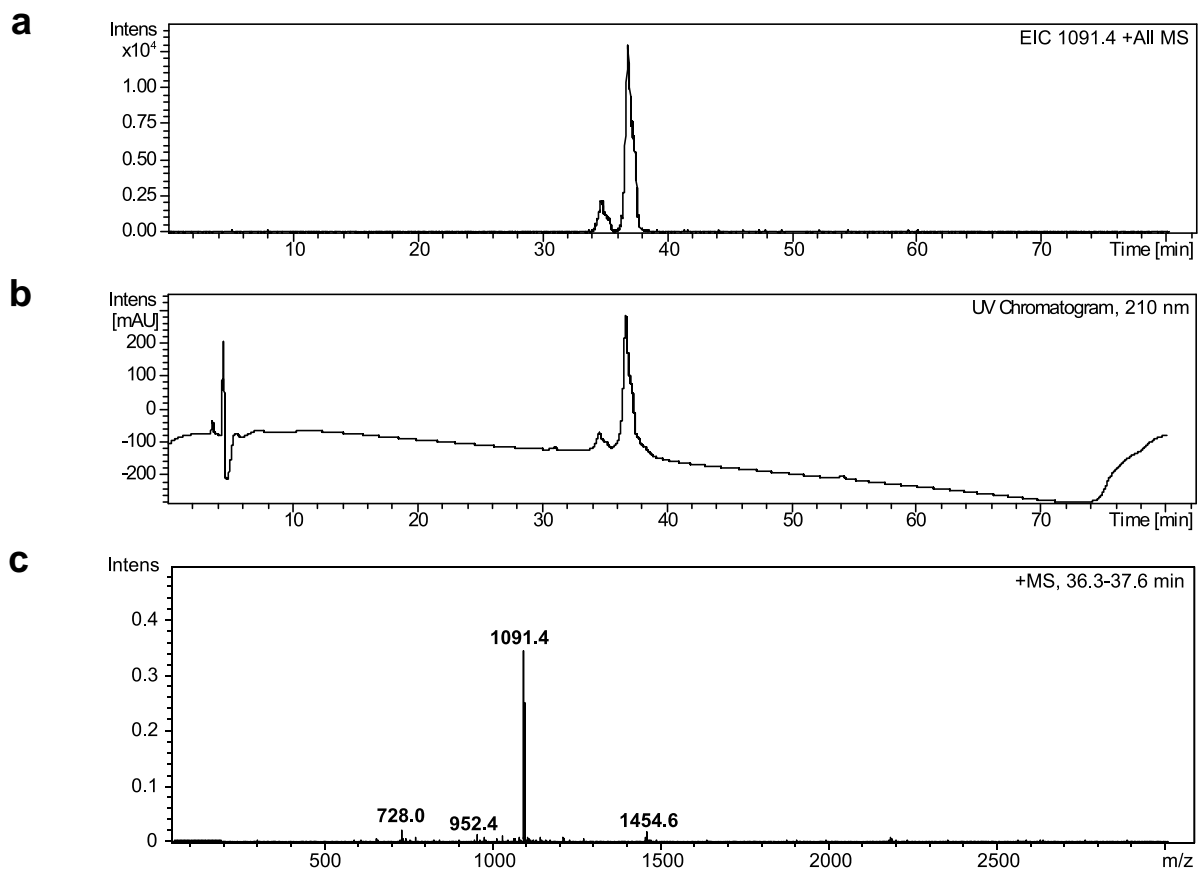
**Abb. 4-4: LC-MS-Spektren von PromoFluor-488-markiertem P31-43 (PF-488-LGQQQPFPPQQPY).** (a) Totalionenstrom (*total ion current*, TIC)-Spektrum; (b) UV-Chromatogramm bei 210 nm; (c) Massenspektrum einzelner Signale bei 17,5 – 17,9 min.  $[M+H]^+ = 1999,9$ ;  $[M+2H]^+ = 1000,5$ ;  $[M+3H]^+ = 667,2$ .



**Abb. 4-5: LC-MS-Spektren von PromoFluor-488-markiertem P56-68 (PF-488-LQLQFPQPQLPY).** (a) Totalionenstrom (*total ion current*, TIC-Spektrum; (b) UV-Chromatogramm bei 210 nm; (c) Massenspektrum einzelner Signale bei 19,1 – 19,5 min.  $[M+H]^+ = 2041,0$ ;  $[M+2H]^+ = 1021,0$ .

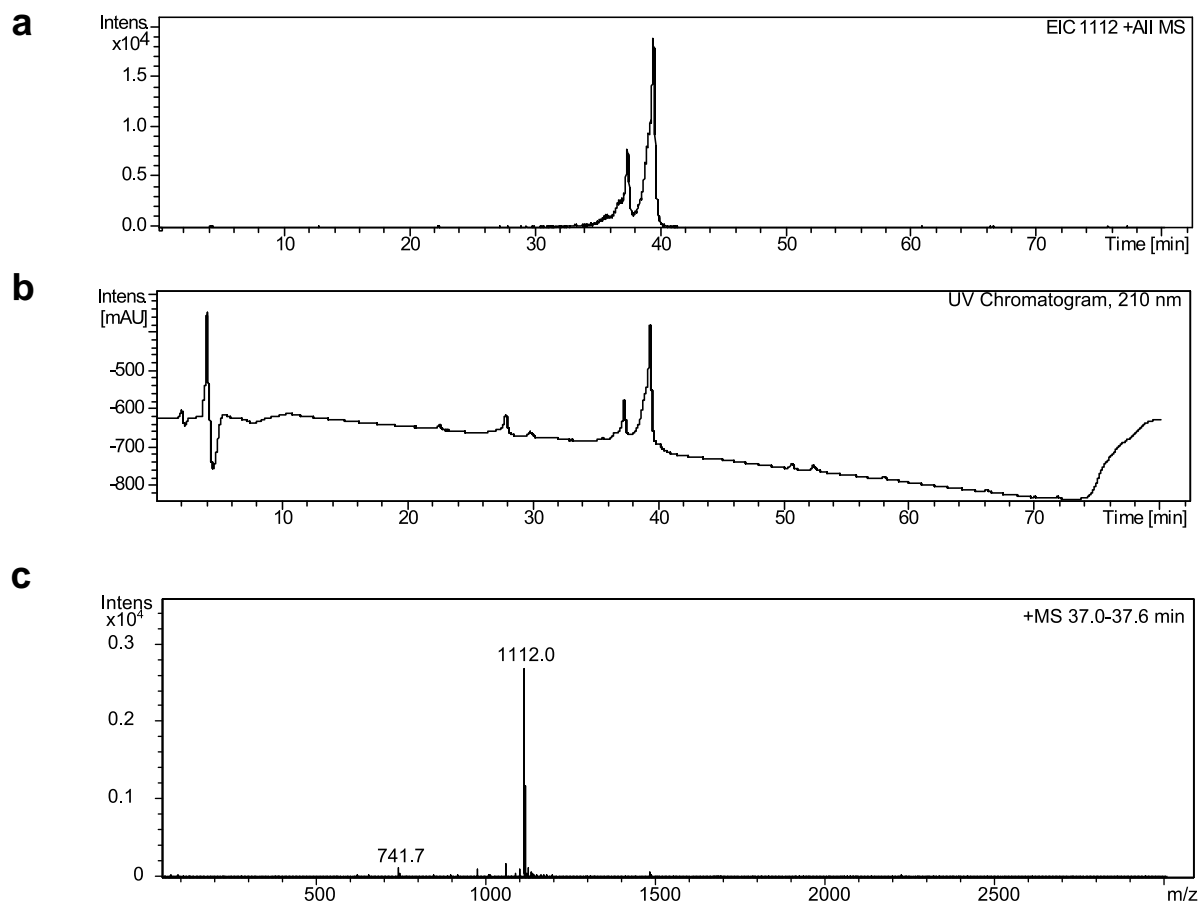
Bei der Kopplung des Farbstoffs Liss musste aus sterischen Gründen zusätzlich ein Abstandshalter zwischen dem Peptid und dem Farbstoff eingesetzt werden. Hierfür wurde Aminohexansäure (Ahx) verwendet, welches bei der Festphasensynthese mit einer *tert*-Butyloxycarbonyl (Boc) –Schutzgruppe an das Peptid gekoppelt wurde. Nach Abspaltung von der festen Phase wurde Liss unter Zugabe von NEt<sub>3</sub> im Lösungsmittel DMF an Ahx gebunden. Das erhaltene Produkt wurde mittels HPLC/RP mit einem MeCN Gradienten (5 - 95 % über 15 min) in H<sub>2</sub>O gereinigt (Liss-P31-43: RP-18 Säule, Flussrate = 2 mL/min, Retentionszeit = 15,2 min; Liss-P56-68: RP-18 Säule, Flussrate = 2 mL/min, Retentionszeit = 10,4 min). Nach der Aufreinigung wurden die Peptide gefriergetrocknet und mittels LC-MS identifiziert (Liss-P31-43: Flussrate = 0,2 mL/min; Retentionszeit = 36 min, Liss-P56-68:

Flussrate = 0,2 mL/min; Retentionszeit = 37 min) (Abb. 4-6 und Abb. 4-7). Es ergab sich eine Ausbeute von 8 % für Liss-P31-43 und 18 % für Liss-P56-68 [111].



**Abb. 4-6: LCMS-Spektren von Lissamin Rhodamin B-markiertem P31-43 (Liss-LGQQQPFPPQQPY).** (a) Extrahiertes Ionenchromatogramm; (b) UV-Chromatogramm bei 210 nm; (c) Massenspektrum einzelner Signale bei 36,3 – 37,6 min.  $[M+2H]^+ = .1091,4$ .





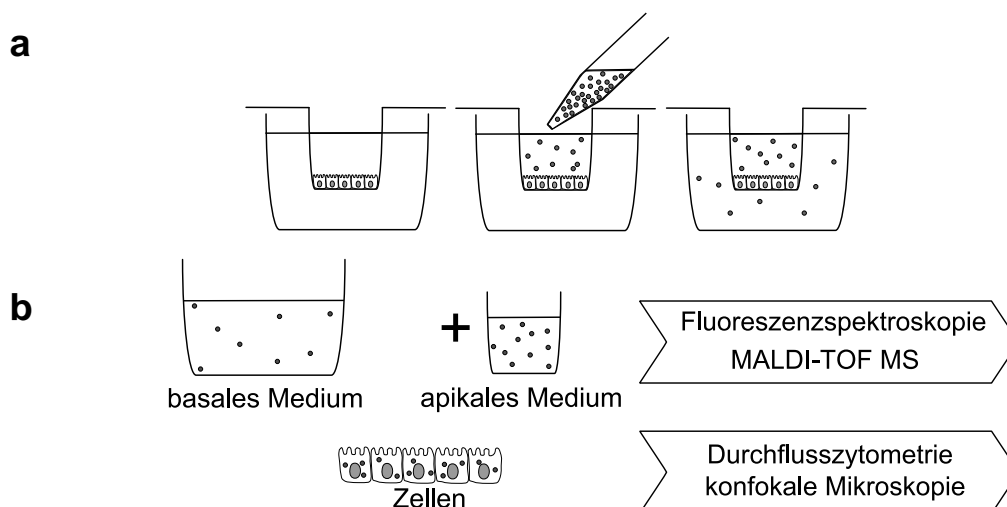
**Abb. 4-7: LCMS-Spektren von Lissamin Rhodamin B-markiertem P56-68 (Liss-LQLQFPQPQLPY).** (a) Extrahiertes Ionenchromatogramm; (b) UV-Chromatogramm bei 210 nm; (c) Massenspektrum einzelner Signale bei 37,0 – 37,6 min.  $[M+2H]^+ = 1111,9$ .

### 4.3 Zelluläre Aufnahme von Gliadinpeptiden

Zur Analyse der Aufnahme und des intrazellulären Transports von fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden (siehe Abschnitt 5.1) wurden Caco-2- bzw. HT-29-Zellen in sogenannten *Chamber slides* mit einer Zellzahl von  $1 \times 10^5$  Zellen/Well ( $1 \text{ cm}^2$ ) mit  $300 \mu\text{L}$  Kulturmedium pro Well ausgesät. Nach Inkubation über 2 - 3 Tage stellte sich eine Konfluenz von 20 – 50 % ein. Für die Inkubation mit Gliadinpeptiden wurde das Medium abgenommen und  $32 \mu\text{mol/L}$  Liss markierte Gliadinpeptide (Liss-P31-43, Liss-P56-68) in  $200 \mu\text{L}$  Kulturmedium pro Well über 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Inkubationsmedium abgenommen und die Zellen dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden  $200 \mu\text{L}$  Kulturmedium zugefügt und der intrazelluläre Transport der Peptide fluoreszenzmikroskopisch mittels *Live-cell imaging* beobachtet.

#### 4.4 Messung des enterozytären Gliadinpeptidtransports

Mittels dieses Versuchsaufbaus wurde die transepitheliale Passage von fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden untersucht (Abb. 4-8). Für die Experimente wurden Caco-2-Zellen verwendet, die nicht häufiger als 20 – 30 Mal passagiert wurden. Diese wurden mit einer Zellzahl von  $7,5 \times 10^4$  Zellen/Well ( $22,3 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) auf Zellkultur-Einsätzen mit semipermeablen Membranen (Porendurchmesser: 0,4 µm) in 24-Well-Platten ausgesät und mit Caco-2-Zellkulturmedium (20 % FKS) kultiviert. Das Kulturmedium wurde sowohl apikal als auch basal alle 2 - 3 Tage gewechselt. Eine vollständige Konfluenz der Zellen wurde nach zwei Tagen beobachtet. Für eine spontane Differenzierung, die zu einer polarisierten Zellmembran führt, wurden die Zellen 14 - 17 Tage kultiviert. Vor und nach jedem Versuch wurde die Integrität des Monolayers durch Messung des transepithelialen elektrischen Widerstands (*transepithelial electrical resistance*, TEER) beurteilt. Monolayer mit einem zu geringen Widerstand ( $< 450 \Omega/\text{cm}^2$ ) wurden verworfen.



**Abb. 4-8: Methodischer Ablauf der Versuche zum enterozytären Gliadintransport.** (a) Caco-2-Monolayer auf Zellkultureinsätzen wurden mit fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden inkubiert. (b) Die Analyse des apikalen und basalen Mediums erfolgte mittels Fluoreszenzspektroskopie zur Quantifizierung der Translokation und mittels Fluoreszenzspektrometrie und matrixunterstützter Laser-Desorptions-Ionisation mit Flugzeitmassenspektrometer-Detektion (*matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight mass spectrometry*; MALDI-TOF-MS) zur Identifikation von strukturellen Veränderungen der Gliadinpeptide. Durchflusszytometrie und konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (*confocal laser scanning microscopy*, CLSM) wurden zur Untersuchung der zellulären Gliadinaufnahme eingesetzt.

Zur Ermittlung von konzentrations- und zeitabhängigen Variationen wurde der Versuch mit verschiedenen Gliadinpeptid-Konzentrationen und Inkubationszeiten

durchgeführt, woraus sich fünf unterschiedliche Versuchsansätze ergaben (Tab. 4-1). Zu Versuchsbeginn wurden die Zellen mit HBSS (200 µl apikal, 900 µl basal) für 30 min im Brutschrank inkubiert. Zur Hemmung der Endozytose wurden 2 mmol/L Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) in das apikale Kompartiment gegeben. Nachfolgend wurden in 100 µL HBSS gelöste fluoreszenzmarkierte Gliadinpeptide (PF-P31-43 bzw. PF-P56-68) in einer äquimolaren Menge auf der apikalen Seite in einer Gesamtkonzentration von 32 µmol/L bzw. 145 µmol/L hinzugefügt. In Versuchsansätzen, in denen die Endozytose gehemmt werden sollte, wurde dieser Ansatz ebenfalls mit 2 mmol/L M $\beta$ CD versetzt. Die Zellen wurden dann im Brutschrank für 3 h bzw. 24 h inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium aus beiden Kompartimenten (apikal und basal) entfernt und für weitere Analysen mittels Fluoreszenzspektrometrie und MALDI-TOF-MS verwendet. Die Zellen wurden für die Durchflusszytometrie (siehe Abschnitt 4.10) und die CLSM (siehe Abschnitt 4.11) aufgearbeitet.

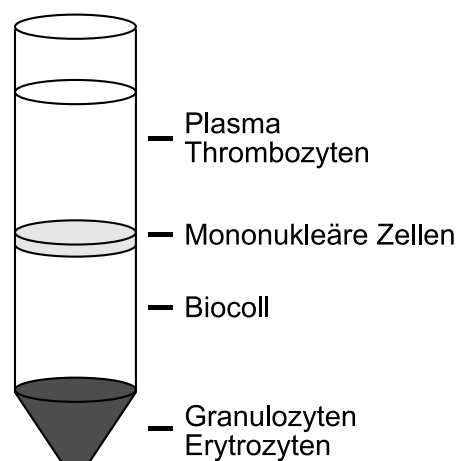
Zur Hemmung der Gliadinaufnahme wurde das Experiment mit 32 µmol/L über 3 h auch bei 4 °C durchgeführt. Dafür wurde der Caco-2-Monolayer mit kaltem HBSS bei 4 °C für 10 min vorinkubiert (200 µl apikal, 900 µl basal). Nach Zusatz der in HBSS gelösten, fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptide auf der apikalen Seite und 400 µL kaltem HBSS auf der basalen Seite wurden die Zellen für 3 h bei 4 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Da es durch die Inkubation bei 4 °C zu einem Absinken der TEER-Werte und somit zu einer erhöhten Durchlässigkeit des Monolayers kam, wurden bei diesem Versuchsansatz lediglich die Zellen für weitere Analysen mittels Durchflusszytometrie und CLSM herangezogen.

**Tab. 4-1: Versuchsansätze zur Messung des enterozytären Gliadinpeptidtransports.**

	Konz.	Zeit	Temp.	Inhibitor	Vol. apikal	Vol. basal
<b>Versuch 1</b>	145 µM	3 h	37 °C		190 µL	900 µL
<b>Versuch 2</b>	32 µM	3 h	37 °C		300 µL	1300 µL
<b>Versuch 3</b>	32 µM	24 h	37 °C		300 µL	1300 µL
<b>Versuch 4</b>	32 µM	24 h	37 °C	M $\beta$ CD	300 µL	1300 µL
<b>Versuch 5</b>	32 µM	3 h	4 °C		300 µL	1300 µL

## 4.5 Isolierung von peripheren mononukleären Zellen

Die peripheren mononukleären Zellen (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) wurden aus Vollblut isoliert. Nach Abzentrifugieren des Vollblutes erhält man ein Leukozytenkonzentrat, den sogenannten *Buffy-Coat*. Dieser Schritt wurde bereits in der Blutbank des Universitätsklinikums Gießen und Marburg (UKGM) am Standort Gießen durchgeführt. Aus diesem lassen sich durch Dichtezentrifugation die PBMCs isolieren. Dazu wurden 10 mL *Buffy-Coat* mit 20 mL PBS vermischt. In ein 50 mL Zentrifugenröhrchen wurden 20 mL Biocoll-Trennlösung vorgelegt und die Mischung aus *Buffy-Coat* und PBS vorsichtig darüber geschichtet. Es folgte eine Zentrifugation bei 500 x g für 15 min ohne den Einsatz einer Zentrifugenbremse. Bei der Dichtezentrifugation sammeln sich die PBMCs als Ring in der Interphase zwischen Biocoll und dem Thrombozyten-reichen Anteil des Plasmas. Am Boden des Zentrifugenröhrchens befinden sich Erythrozyten und Granulozyten als Sediment (Abb. 4-9). Die PBMCs wurden in ein neues 50 mL Zentrifugenröhrchen übertragen (maximal zwei Ringfraktionen pro Zentrifugenröhrchen) und zum Waschen auf 50 mL mit PBS aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation bei 300 x g für 10 min. Der resultierende Überstand wurde abgenommen und verworfen und die als Pellet zurückgebliebenen Zellen im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert und mittels Hämozytometer gezählt.



**Abb. 4-9: Phasentrennung durch Dichtezentrifugation.** Trennung unterschiedlicher Zellphasen mittels Biocoll. Adaptiert nach [112].

### 4.5.1 Kultivierung von T-Zell-Klonen

Zur Untersuchung der Proliferation von T-Zellen wurden der T-Zell-Klon N10 (spezifisch für die Interaktion mit HLA-DQ2-präsentiertem Glia- $\alpha$ 9

(LQFPQPELPYPQ)) und ein T-Zell-Klon gegen das Antigen Hitzeschockprotein (*heat shock protein*, HSP) Peptid 3-14 (HSP 3-14) aus *Mycobacterium tuberculosis* (spezifisch für die Interaktion mit HLA-DR3-präsentiertem Peptid HSP 3-14 mit der Aminosäuresequenz KTIA YDEEARRGL) durch die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Frits Koning (Department of Immunohematology and Blood Transfusion, Leiden University Medical Center, NL) bereitgestellt.

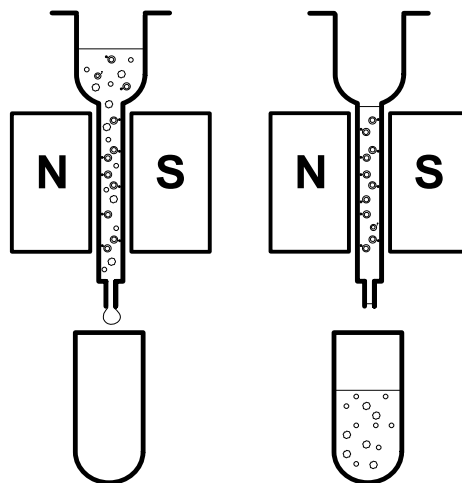
Die Kultivierung von T-Zellen erfolgte in 24-Well-Platten. Zur Wachstumsstimulation von T-Zellen wurden die isolierten PBMCs (siehe Abschnitt 4.5) oder bereits isolierte T-Zell-Klone mit T-Zell-Stimulationsmedium inkubiert, das zur Proliferationsstimulation mit IL-2 und IL-15 angereichert war. Die Zellen wurden je nach Wachstum alle 2 – 3 Tage mit neuem T-Zell-Medium versorgt bzw. bei hoher Wachstumsdichte auf mehrere Wells aufgeteilt. Nach ca. 10 – 15 Tagen nahm die Proliferationsrate ab und die Zellen gingen von einer tropfenförmigen in eine runde Form über. Dieses Stadium entspricht der stationären Phase des Zellwachstums, wie sie für den Einsatz im T-Zell-Proliferationsassay benötigt werden. Daher werden die Zellen in der stationären Phase entweder restimuliert, um diese weiter zu vermehren, oder bei ausreichender Zellzahl für die Verwendung in Proliferationsassays eingefroren. Zur Restimulation der Zellen wurde ein sogenannter *Feeder-Mix* erstellt. Dieser enthielt neben 1 mL T-Zell-Medium 1 µg/mL PHA sowie  $10^6$  *Feeder*-Zellen. Die *Feeder*-Zellen bestanden dabei aus PBMCs zweier unterschiedlicher Donoren, die zur Hemmung der weiteren Proliferation mit 3000 rad bestrahlt wurden. Zur Restimulation wurden ungefähr  $3 \times 10^5$  T-Zellen mit 1 mL *Feeder-Mix* inkubiert. Am Tag 5 erfolgte die Zugabe von 0,5 mL T-Zell-Medium. Die Kultur wurde wie vorher beschrieben fortgesetzt.

Für die innerhalb dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurden T-Zell-Klone der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Frits Koning (Leiden, Niederlande) genutzt. Dabei handelte es sich um den HLA-DQ2-spezifischen T-Zell-Klon N10 und einen HLA-DR-spezifischen T-Zell-Klon gegen *Mycobacterium tuberculosis*.

#### 4.5.2 Isolation von Monozyten

Die Isolation von Monozyten aus PBMCs erfolgte mittels *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS). Hierbei werden CD14-spezifische Antikörper, die mit einem magnetischen *Bead* gekoppelt sind, an CD14<sup>+</sup> Zellen gebunden und diese durch eine

in einen Magneten eingesetzte Säule selektiert (Abb. 4-10). Für die Isolation von Monozyten mittel MACS wurden die Zellen zentrifugiert (300 x g, 10 min) und der Überstand möglichst komplett entfernt. Die Zellen wurden in 4  $\mu\text{L}$  MACS-Puffer pro  $10^6$  Zellen suspendiert und 1  $\mu\text{L}$  CD14 *Microbead*-Antikörper pro  $10^6$  Zellen hinzugefügt. Nach Durchmischung dieses Ansatzes in Zentrifugenröhrchen mittels Vortex wurde die Suspension zur Bindung der Antikörper 15 min bei 4 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen durch Zufügen von 1 - 2 mL MACS-Puffer pro  $10^7$  Zellen gewaschen und mit 300 x g 10 min zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde in 500  $\mu\text{L}$  MACS-Puffer pro  $10^8$  Zellen resuspendiert. Nach Befeuchtung der Säule mit MACS-Puffer wurden pro Trennsäule  $10^8$  Zellen (in 500  $\mu\text{L}$ ) aufgetragen und durch die magnetische Säule laufen lassen. Nach dem Durchlauf wurde drei Mal mit 500  $\mu\text{L}$  MACS-Puffer pro Säule nachgespült um verbleibende, nicht gebundene Zellen zu entfernen. Die magnetisch in der Säule gebundenen Zellen wurden nach Entfernung der Säule vom MACS-Separator mit MACS-Puffer in ein neues Zentrifugenröhrchen eluiert. Darauf folgend wurden die Zellen gezählt, zentrifugiert (300 x g, 10 min) und im entsprechenden Kulturmedium resuspendiert, sodass diese für die Differenzierung zu iDC bereit waren. Die Kontrolle des Phänotyps erfolgte mittels durchflusszytometrischer Bestimmung der Expression der Oberflächenmoleküle CD3, CD19, HLA-DR, CD14, CD11c, CD80, CD83 und CD86.



**Abb. 4-10: Funktionsprinzip von MACS.** Durch Bindung spezifischer Antikörper, die mit magnetischen *Beads* gekoppelt sind, können Zellen mit den entsprechenden Oberflächenantigenen durch Einsatz eines Magnets selektiert werden. Adaptiert nach [113].

### 4.5.3 Generierung unreifer dendritische Zellen

Zur Generierung von iDC wurden isolierte Monozyten über 5 Tage mit 2 mL Differenzierungsmedium (Monozyten-Kulturmedium + 1000 U/mL GM-CFS + 500 U/mL IL-4) kultiviert, wobei nach 3 Tagen 1 mL frisches Differenzierungsmedium hinzugefügt wurde. Von den generierten iDC wurde eine Kontrolle des Phänotyps mittels Durchflusszytometrie vorgenommen. Dafür wurden die Zellen durch vorsichtiges mechanisches Schaben von der Oberfläche des Wells gelöst. Die Kontrolle des Phänotyps erfolgte anhand der Expression der Oberflächenmoleküle CD3, CD19, CD14, CD11c, CD1a, CD209, CD80, CD83 und CD86. Die Marker CD3 und CD19 wurden einer Kontamination mit T- bzw. B-Zellen zugeordnet [114,115]. CD11c ist positiv bei Monozyten und iDC / DC [116]. Die Generierung von iDC erfolgte unter der Abnahme von CD14 sowie der Zunahme von CD1a, CD86 und CD209 [117]. Eine fortgeschrittene Reifung der DC wurde durch einen weiteren Anstieg von CD86 sowie einer positiven Oberflächenexpression von CD80 und CD83 beurteilt [118].

### 4.6 Inkubation unreifer dendritischer Zellen mit Gliadinpeptiden

Zur Beurteilung des Einflusses von Gliadinpeptiden auf die Reifung und Zytokinsekretion von iDC wurden CD14<sup>+</sup> Zellen aus drei unterschiedlichen *Buffy-Coats* isoliert und diese zur Generierung von iDC mit GM-CFS und IL-4 inkubiert. Die generierten iDC wurden mit 5 µg/mL LPS, den Gliadinpeptiden P31-43 und P56-68 (jeweils 100 µg/mL) sowie dem basalen Zellkulturmedium aus dem Versuchen zum enterozytären Transport von Gliadinpeptiden (siehe Abschnitt 4.4) inkubiert. Die Inkubation erfolgte mit  $1,5 - 2,5 \times 10^6$  Zellen in 1,5 mL/Well über 24 h. Die eingesetzten Inkubationsansätze wurden vor Verwendung steril filtriert. Als zugrundeliegende Inkubationsmedien wurde RPMI + 2 % HS oder HBSS verwendet. Die Inkubation der Kontrolle erfolgte allein mit dem entsprechenden Inkubationsmedium. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Zellen durch Abschaben der Zellen gelöst und für die folgende durchflusszytometrische Analyse vorbereitet. Beurteilt wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD3, CD19, CD14, CD11c, CD1a, CD209, CD80, CD83 und CD86. Eine Reifung der iDC wird durch einen weiteren Anstieg von CD86 sowie einer positiven Oberflächenexpression von CD80 und CD83 angezeigt [118]. Das Medium der Zellen wurde für die

Bestimmung der Zytokinsekretion bei -20 °C eingefroren. Mittels *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) wurden die ins Medium sezernierten Zytokine IL-8, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  bestimmt.

#### **4.7 Stimulation der Expression von HLA-Molekülen auf Caco-2- und HT-29-Zellen**

Zur Analyse der HLA-Klasse-I-, HLA-DR- und HLA-DQ-Expression auf HT-29- und Caco-2-Zellen wurden Zellen in 24-Well Platten verwendet, die eine Konfluenz von 50 – 70 % aufwiesen. Die unbehandelten Kontrollen wurden im entsprechenden Kulturmedium kultiviert. Neben den unbehandelten Zellen wurden Caco-2- und HT-29-Zellen mit 500 U/mL IFN- $\gamma$  bzw. mit 100  $\mu$ g/mL P31-43 oder P56-68 über 24 h inkubiert. Nach Ende der Inkubation wurden die Zellen mit PBS gewaschen und durch Inkubation mit 0,5 mL TrypLE-Lösung von der Platte gelöst. Nach dem Ablösen der Zellen wurde zum Stoppen der Trypsinierung 1 mL des entsprechenden Kulturmediums zugegeben. Die Analyse der Oberflächenexpression von HLA-Klasse-I (HLA-ABC bzw. HLA-A2), HLA-DR und HLA-DQ erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse.

#### **4.8 Fluoreszenzspektroskopie**

Die Beurteilung der Translokation von fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden aus dem Versuch zum enterozytären Transport von Gliadinpeptiden (siehe Abschnitt 4.4) erfolgte mittels Fluoreszenzspektroskopie. Die Messung der Fluoreszenzintensität im apikalen und basalen Zellkulturmedium wurde mittels Mikrotiterplatten-Fluorometer (Filter:  $\lambda_{\text{abs}} = 485 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 538 \text{ nm}$ ) in 24-Well-Platten vorgenommen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der Gerätesoftware Ascent sowie dem Biostatistikprogramm Graph Pad Prism 4.03. Hierbei wurde der prozentuale Anteil der basalen Fluoreszenzintensität bezogen auf die jeweilige apikale Fluoreszenzintensität berechnet und mit einem ungepaarten t-Test statistisch evaluiert.

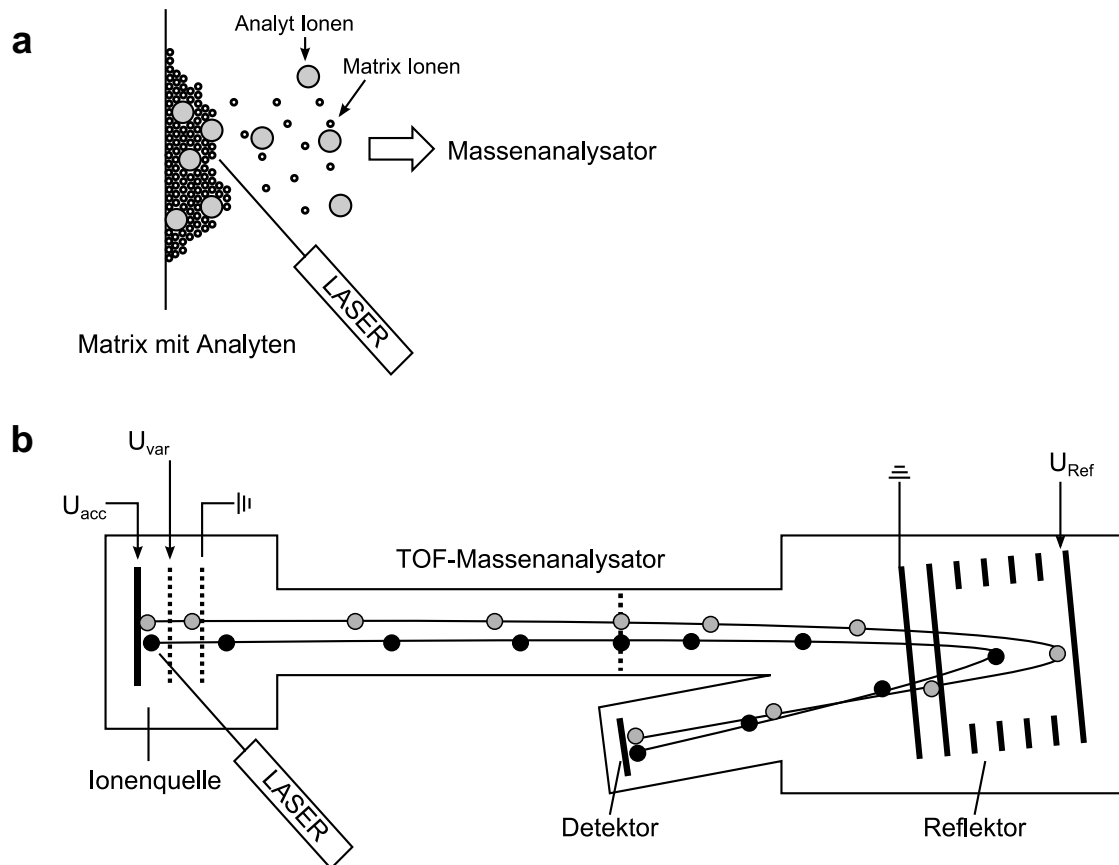


## 4.9 MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Zur Beurteilung eines möglichen Peptidabbaus während des experimentellen enterozytären Transports von Gliadinpeptiden (siehe Abschnitt 4.4) wurde eine Analyse des apikalen und basalen Mediums mittels MALDI-TOF-MS durchgeführt. Die massenspektrometrischen Analysen erfolgten durch Prof. Dr. Günter Lochnit (Biochemisches Institut des Fachbereichs Medizin der JLU Gießen).

Hierfür wurden die Proben durch Verwendung von C18-ZipTip-Pipettenspitzen (Millipore) konzentriert und entsalzt. Das Probenmaterial wurde anschließend in eine Matrix aus 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) / Methylenbisphosphorsäure eingebracht und auf einen Metallträger aufgetragen. Nach Kokristallisation von Matrix und Analyt wurde die Probe durch Laserimpulse beschossen, wodurch die Matrix sublimiert und eine explosionsartige Freisetzung von Ionen generiert wird. Im Vakuum werden die Ionen dann mit einer festgelegten kinetischen Energie beschleunigt und wandern in den Flugzeitanalysator. Kleinere Ionen haben dabei eine höhere Beschleunigung und werden vom Detektor früher erfasst als größere, wodurch das Flugzeit-Spektrum erzeugt wird (Abb. 4-11) [119].

Die MALDI-TOF-MS-Analyse erfolgte mittels eines Bruker Ultraflex I Instruments (Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Zur Kalibrierung wurde ein externer Standard-Peptid-Mix (Bruker Daltonics) verwendet. Die MS-Spektren wurden durch die Software FlexAnalysis 3.0 (Bruker Daltonics) prozessiert. Die resultierenden Spektren wurden durch Einbeziehung der  $H^+$ ,  $Na^+$  und  $K^+$  Addukte ausgewertet. Die Massen wurden Peptiden zugeteilt, die durch die enzymatische Hydrolyse von Gliadinpeptiden erklärbar sind [71]. Hierbei wurde für die Identifikation eine Toleranz der Masse von  $\pm 1$  gewährt. Mittels der relativen Flächen unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) erfolgte eine Quantifizierung, wobei die Flächen aller Isotopenpeaks aus einem Cluster aufsummiert wurden. Diese Werte wurden auf die Summe der AUC aller identifizierten Peaks bezogen, also alle Peaks, die als Peptid oder Abbauprodukt dieses Peptids zu identifizieren waren. Die Werte von drei unabhängigen Experimenten wurden als Mittelwerte angegeben. Basierend auf der Affinität für bestimmte Aminosäurebindungen von Peptidasen, die auf der intestinalen Bürstensaummembran lokalisiert sind, wurde der Abbau von P31-43 und P56-68 rekonstruiert.



**Abb. 4-11: Schema des MALDI-TOF-MS-Verfahrens.** (a) Eine mit der Matrix kokristallisierte Probe wird mit einem Laser beschossen, was zur Sublimation und Ionisation der Peptide führt. (a) Die durch den MALDI-Prozess erzeugten Ionen werden durch eine festgelegte kinetische Energie beschleunigt und wandern in den Flugzeitanalysator. Ein Ionenreflektor kehrt die Flugbahn der Ionen um, wodurch die initialen Energiedifferenzen durch die Beschleunigung korrigiert werden. Das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) ist mit der Zeit verbunden, die ein Ion benötigt um den Detektor zu erreichen, wobei die leichteren Ionen den Detektor zuerst erreichen. Die Detektion erfolgt durch einen Elektronenmultiplier. Adaptiert nach [119].

## 4.10 Durchflusszytometrie

Zur Analyse der Expression von Oberflächenmolekülen sowie zur Beurteilung der Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden wurde die Methodik der Durchflusszytometrie verwendet.

Die Beurteilung der zellulären Peptidaufnahme im Versuch zum enterozytären Transport von Gliadinpeptiden (siehe Abschnitt 4.4) erfolgte durch Detektion des Fluoreszenzfarbstoffs Promofluor-488. Die inkubierten Caco-2-Zellen wurden durch Behandlung mit einer Trypsin (0,05 %) / EDTA (2,4 mmol/L) -Lösung von der Membran gelöst und vereinzelt (37 °C, ca. 8 min). Die vereinzelter Zellen wurden in ein 1,5 mL-Einmalreaktionsgefäß überführt, herunterzentrifugiert (300 x g, 2 min) und mit jeweils 1 mL FACS-Puffer zweimal gewaschen. Nachfolgend wurde das Zellpellet

in 500 µL FACS-Puffer resuspendiert und die Zellen mit dem Durchflusszytometer Guava easyCyte mini und der Software CytoSoft 4.2.1 analysiert.

Zellen, bei denen die Oberflächenstrukturen mittels Antikörpermarkierung nachgewiesen werden sollten (siehe Abschnitt 5.3 und 5.4), wurden mit FACS-Puffer gewaschen (in 1,5 mL Einmalreaktionsgefäß: 300 x g, 2 min oder in FACS-Röhrchen: 300 x g, 5 min) und in ca. 50 µL FACS-Puffer resuspendiert. Nach Zufügen von 5 µL der entsprechenden Antikörperlösung erfolgte eine Inkubation über 30 min bei 4 °C unter Lichtausschluss zur Bindung der Antikörper an die jeweiligen Epitope. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Bei der Analyse der DC wurden die Zellen aufgrund des großen Probenumfangs und der damit verbundenen längeren Analysedauer (2 – 3 h) mit 1%iger PFA-Lösung fixiert. Die Messung der Proben erfolgte zum einen mit dem Durchflusszytometer Guava easyCyte mini und der Software CytoSoft 4.2.1 (siehe Abschnitt 5.2 und 5.4), zum anderen mit dem Durchflusszytometer FACSCalibur und der Software Cell Quest Pro 6.0 (siehe Abschnitt 5.3 und 5.4). Bei der Verwendung von Mehrfachfärbungen in einer Probe wurden zur Kompensation der spektralen Überlappungen Positivkontrollen mit Einzelfärbungen durchgeführt. Zum Ausschluss unspezifischer Bindungen wurde für jeden Zelltyp und jedes Immunglobulin eine Isotypenkontrolle gemessen.

Die Auswertung erfolgte mit der entsprechenden Software des Durchflusszytometers oder FlowJo vX0.6. Im Fall der CD14<sup>+</sup>-selektierten PBMCs wurden zur Eingrenzung von Kontaminationen die CD3<sup>+</sup> bzw. CD19<sup>+</sup> Populationen bestimmt. Da diese Markierungen T- bzw. B-Zellen zuzuordnen sind, wurden diese für die weitere Analyse von Monozyten und iDC nicht miteinbezogen.

Zur Darstellung als Säulendiagramm wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (*mean fluorescence intensity*, MFI), nach Subtraktion der Fluoreszenzintensität der Kontrolle, oder der prozentuale Anteil der Fluoreszenzintensität der Kontrolle gebildet.

Die weitere statistische Auswertung erfolgte mit der Software Graph Pad Prism (Version 4.03 und 6.04). Beim Vergleich der zellulären Aufnahme von Gliadinpeptiden (siehe Abschnitt 5.2.2) wurde zur Bestimmung des Signifikanzniveaus ein ungepaarter t-Test durchgeführt.

Zur Berechnung der Signifikanz in Abschnitt 5.3 erfolgte eine einfaktorielle Varianzanalyse (*One Way ANOVA*). Zum Vergleich der Gruppen untereinander wurde ein Fisher-LSD Post-hoc-Test durchgeführt.

#### 4.11 Konfokale Laser Scanning Mikroskopie

Die mikroskopischen Analysen der zellulären Aufnahme und des Transports von fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden (siehe Abschnitt 5.1) erfolgte mittels *Live cell imaging*. Hierbei wurden Einzelbilder der lebenden Zellen in Kultur in 30 sec-Intervallen über 10 min aufgenommen. Anschließend erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS eine Fixierung der in *Chamber slides* befindlichen Zellen mit PFA-Lösung (3%ig) über 5 min. Nach nochmaligem Waschen wurden die Zellen mit einem *Mounting Medium* konserviert.

Zur mikroskopischen Analyse der zellulären Peptidaufnahme innerhalb der Versuchsreihe zur Untersuchung des enterozytären Gliadinpeptidtransports (siehe Abschnitt 4.4) wurden die Caco-2-Monolayer zweimal mit PBS gewaschen und mit 3%iger PFA-Lösung über 5 min fixiert. Die Färbung der DNA erfolgte mit Höchst 33342 (1:1000 in PBS) über 5 min. Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit PBS wurde die Membran mit den Caco-2-Monolayern vom übrigen Zellkultureinsatz gelöst und mittels Prolong Gold und einem Deckgläschen auf einem Objektträger montiert. Die Versiegelung und Befestigung der Deckgläschen auf dem Objektträger erfolgte durch Umrandung mit transparentem Nagellack.

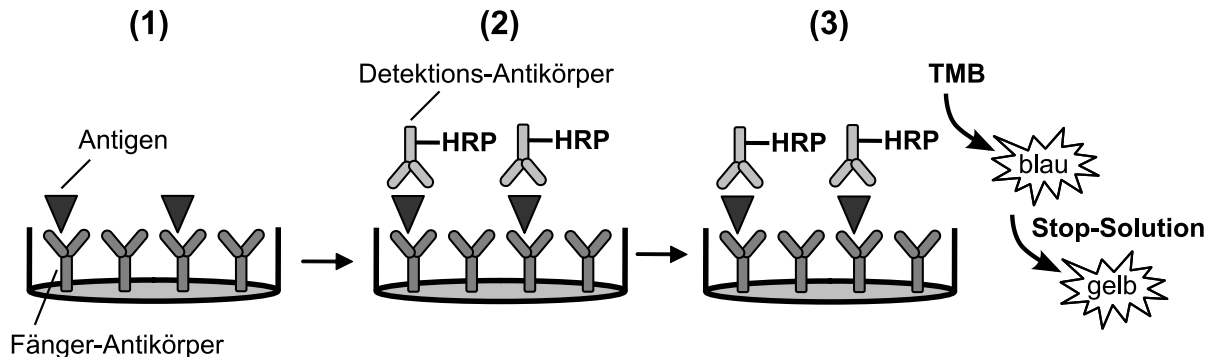
Zur Untersuchung wurde ein Objektiv mit 60-facher und 100-facher Vergrößerung gewählt. Die mikroskopische Analyse erfolgte am konfokalen Laser-Scanning Mikroskop Nikon TE2000 und der Software EZ-C1 3.80 und NIS Elements 3.0 für dreidimensionale Darstellungen. Zum *Tracking* von Bewegungen auf zellulärer Ebene wurde die Software ImageJ 1.47t verwendet.

#### 4.12 ELISA

Mit Hilfe von Festphasen-Enzymimmunoassays (ELISA) wurde die Sekretion von IL-8, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$ 1 quantifiziert. Das allgemeine Funktionsprinzip eines solchen Assays ist die Bindung eines Antigens an einen Enzym-gekoppelten spezifischen Antikörper. Durch das Enzym wird ein Substrat umgesetzt, wodurch eine

Farbreaktion erzeugt wird, welche gemessen werden kann und eine Quantifizierung des gesuchten Antigens erlaubt.

Die in dieser Arbeit verwendeten Quantikine ELISA Kits funktionieren nach dem Prinzip eines *Sandwich*-ELISAs. Das Funktionsprinzip ist in Abb. 4-12 dargestellt. Es besteht aus einer 96-Well-Platte, die mit einem für das zu testende Protein spezifischen Antikörper, dem sogenannten Fänger-Antikörper, beschichtet ist. Nach Zugabe eines Standards oder einer Probe, in welcher das entsprechende Antigen enthalten ist, bindet dieses an die Fänger-Antikörper. Durch Zugabe von Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) – gekoppelten Antikörpern, den sogenannten Detektions-Antikörpern, wird eine spezifische Markierung des Antigens erreicht. Die gebundene Peroxidase metabolisiert Hydrogenperoxid, was zur Oxidation des zugegebenen Chromogens 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) und somit zu einer Blaufärbung führt. Mittels Schwefelsäure wird die enzymatische Reaktion gestoppt und eine pH-Wert-abhängige Gelbfärbung erfolgt. Die zur Antigenkonzentration proportionale Extinktion kann bei 450 nm mittels Mikroplattenlesers gemessen werden.



**Abb. 4-12: Funktionsprinzip des Quantikine ELISA.** (1) An die mit Fänger-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte binden die zugegebenen Antigene in Standards bzw. Probenmaterial. (2) Der mit HRP-gekoppelte Detektions-Antikörper bindet an das entsprechende Antigen. (3) Durch Umsatz des Substrates TMB durch HRP erfolgt eine Farbreaktion.

Die Durchführung der ELISA Kits erfolgte entsprechend der Herstellerangaben. Die Erstellung von Verdünnungsreihen aus den jeweiligen Standardlösungen des Kits ermöglichte eine Quantifizierung. Um neben der immunreaktiven auch die latente Form von TGF- $\beta$ 1 zu detektieren, erfolgte eine Aktivierung entsprechend der Angaben des Herstellers. Die Messung der optischen Dichte (OD) wurde bei 450 nm durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit der Software MicroWin 2000. Die OD des Leerwertes wurde hierbei von den übrigen Messwerten subtrahiert. Aus der

Standardreihe wurde mittels dem nichtlinearen Regressionsmodell der *four parameter logistic* (4-PL) eine Standardkurve berechnet anhand der die IL-8, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  Konzentration in den gemessenen Proben ermittelt werden konnte. Entsprechend den Herstellerangaben sollte die mittlere minimal detektierbare Konzentration für IL-8 bei 3,5 pg/mL, für TNF- $\alpha$  bei 1,6 pg/mL und für TGF- $\beta$  bei 4,61 pg/mL liegen. Im Fall von IL-8 wurde die mittlere minimal detektierbare Konzentration bei 11 Messwerten unterschritten. Diese wurden dennoch in die statistische Auswertung miteinbezogen. Für Proben die aufgrund ihrer geringen Konzentration durch das Geräte-spezifische Limit nicht detektiert werden konnten, wurden für die statistische Auswertung 0,001 pg/mL verwendet.

Für die weitere statistische Auswertung mit der Software Graph Pad Prism 6.04 erfolgte die Berechnung der Signifikanz mittels der einfaktoriellen Varianzanalyse. Zum Vergleich der Gruppen untereinander wurde ein Fisher-LSD Post-hoc-Test durchgeführt.

#### **4.13 [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Proliferationsassay**

Mit dem T-Zell-Proliferationsassay sollte untersucht werden, ob es durch bestimmte MHC-Moleküle zu einer Präsentation von Antigenen auf APZ bzw. zu einer daraus folgenden Interaktion und Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen kommt.

Da die APZ selbst nicht mehr proliferieren sollten, wurden diese mittels Bestrahlung (3000 rad) oder Mitomycin-C Behandlung inaktiviert. Hierfür wurde Mitomycin-C in einer Konzentration von 1 mg/mL in Wasser gelöst. Die gewaschenen Zellen wurden zu je  $1 - 5 \times 10^6$  Zellen in 1 mL T-Zell-Kulturmedium mit 100  $\mu\text{L}$  Mitomycin-C Lösung für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die Zellen drei Mal mit T-Zell-Kulturmedium und anschließender Zentrifugation (10 min, 300 x g) gewaschen. Die inaktivierten APZ wurden in T-Zell-Kulturmedium mit 20 % HS resuspendiert, so dass sich eine Zellsuspension von  $10^5$  Zellen pro 50  $\mu\text{L}$  ergab. 50  $\mu\text{L}$  der Zellsuspension pro Well wurden mit 50  $\mu\text{L}$  der Antigenlösung in IMDM (+1 % Glutamin) bei 37 °C inkubiert. Nach 1 h wurden  $1,5 \times 10^5$  antigenspezifische T-Zellen in 50  $\mu\text{L}$  T-Zell-Kulturmedium zu den APZ pipettiert. Hierbei wurden T-Zellen verwendet, die sich in der stationären Phase befanden. Es folgte eine Inkubation über 48 h im Brutschrank.

Für den [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin-Proliferationsassay wurden je Well 50  $\mu\text{L}$  [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin (10  $\mu\text{Ci/mL}$ ) hinzugefügt. [ $^3\text{H}$ ]-Thymidin wird während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA eingebaut und dient als Marker für die DNA Synthese und somit als Marker für die Zellproliferation [120]. Nach ca. 18 h Inkubation erfolgte die Übertragung der Zellen auf einen Fiberglasfilter. Der Fiberglasfilter wurde getrocknet und in eine Proben tasche gelegt. Diese wurde mit Szintillationsflüssigkeit *Betaplate Scint* gefüllt und verteilt, bis der Filter befeuchtet war und mittels Schweißnaht verschlossen. Die Messung erfolgte mittels eines Szintillations-Zählers. Der Szintillator wird von der Beta-Strahlung des [ $^3\text{H}$ ]-Thymidins angeregt und gibt die Anregungsenergie in Form von UV-Strahlung ab, deren Intensität mittels Szintillations-Zähler ermittelt werden kann.

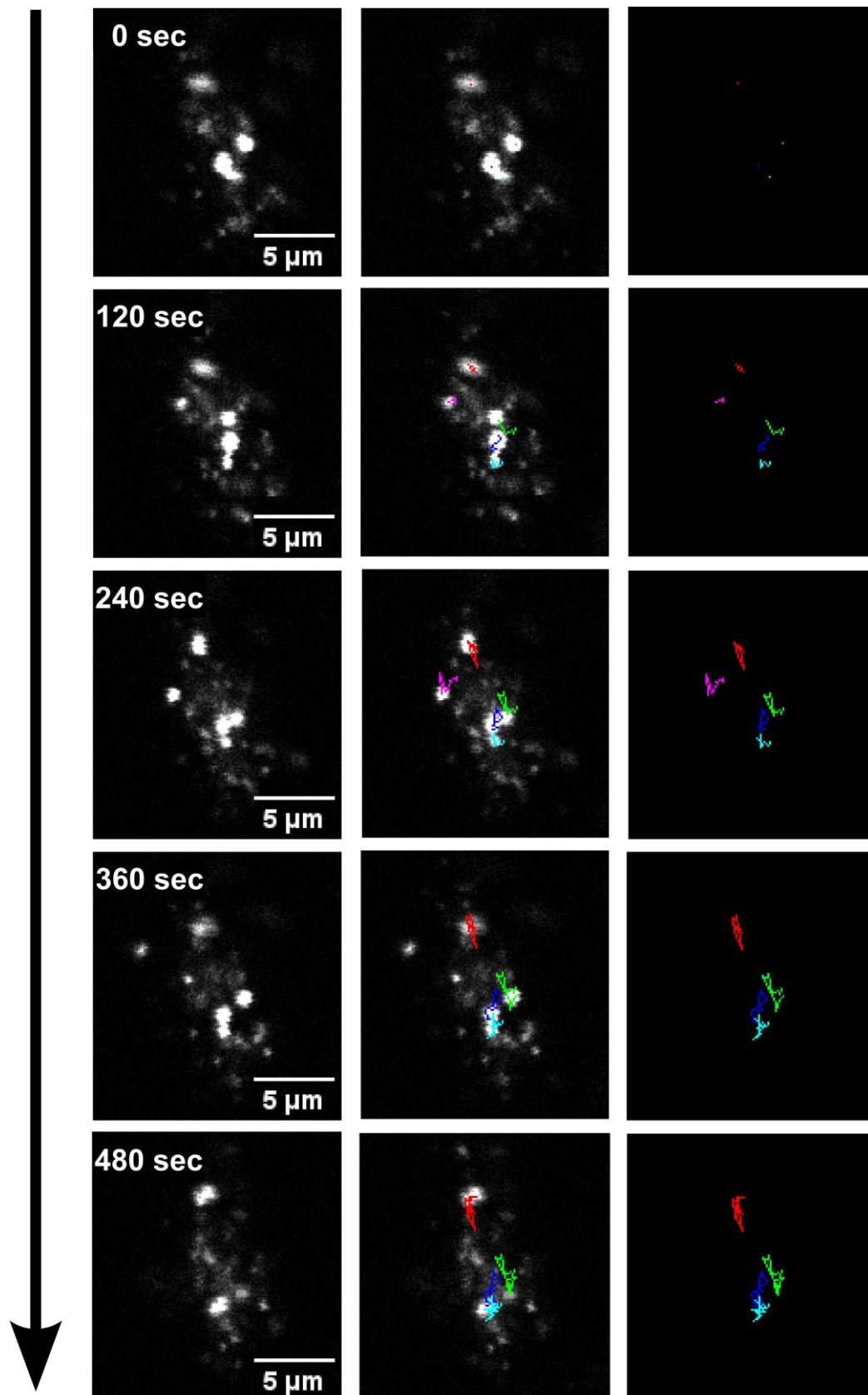
Die statistische Auswertung erfolgte mit einem ungepaarten T-Test unter Zuhilfenahme der Software Graph Pad Prism 4.03.

## 5 Ergebnisse

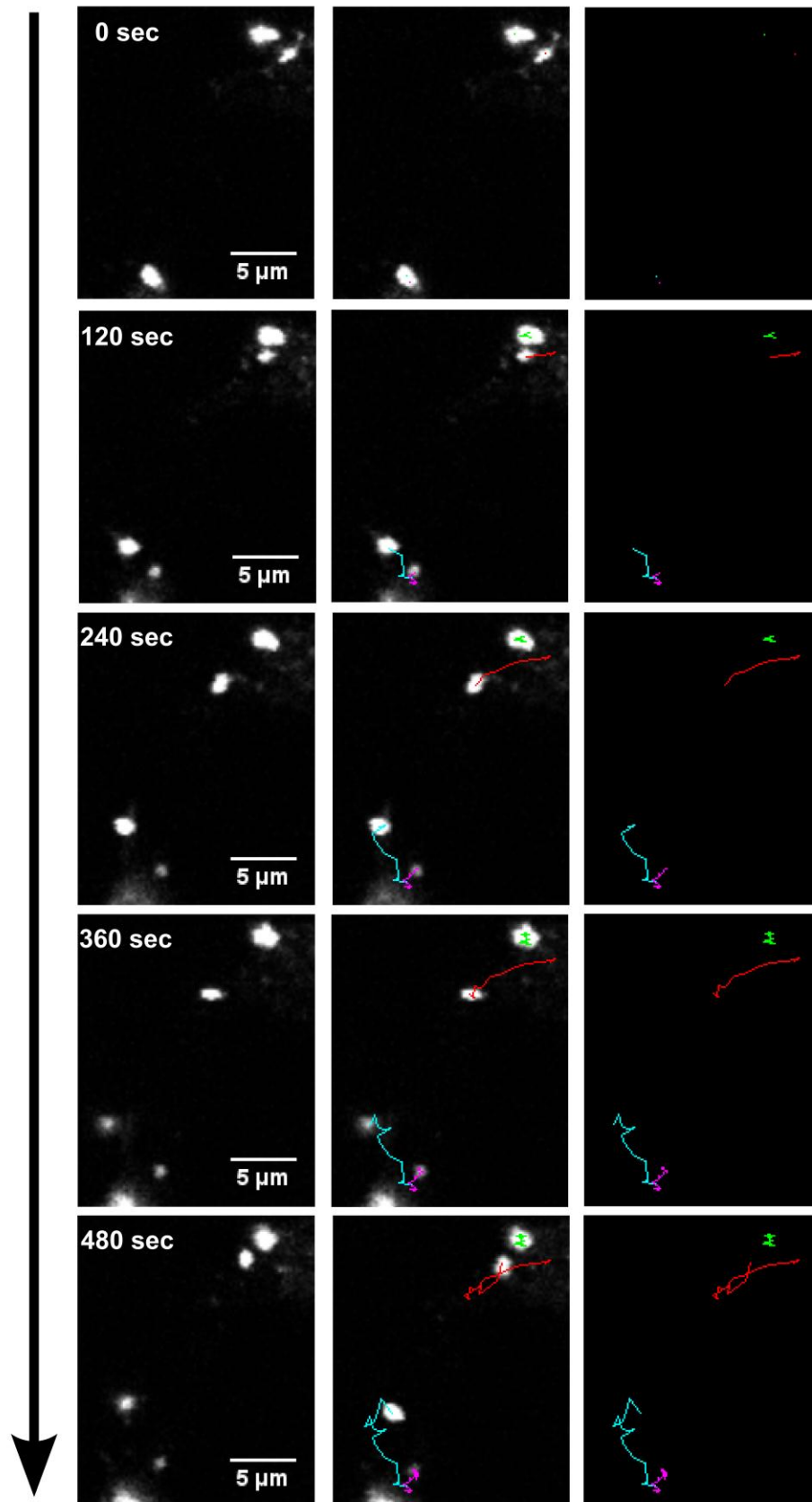
### 5.1 Aufnahme und Transport fluoreszenzmarkierter Gliadinpeptide

Zur Untersuchung der Aufnahme und des Transports von Gliadinpeptiden in Enterozyten wurden Caco-2-Zellen als Modell eingesetzt, wobei die Detektion der fluoreszenzmarkierten Peptide mittels CLSM erfolgte. Die in Chamber Slides ausgesäten Zellen wurden mit 70 µg/mL Lissamin Rhodamin B- markierten Gliadinpeptide P31-43 (Liss-P31-43) und P56-68 (Liss-P56-68) über 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS und anschließender Zugabe von Kulturmedium wurde der Gliadinpeptidtransport in den Zellen mittels Echtzeitaufnahmen in 30 sec-Intervallen beobachtet. Beim Einsatz beider Peptide war durch Vergleich der einzelnen Aufnahmen eine Bewegung der Gliadinpeptide erkennbar (Abb. 5-1 und Abb. 5-2). Dabei kam es sowohl zu Verschmelzungen als auch zur Auftrennung von Vesikeln.





**Abb. 5-1: Transport von P31-43 in Caco-2-Zellen.** Inkubation von Caco-2-Zellen mit 70 µg/mL Liss-P31-43 über 30 min und nachfolgender Bildsequenzaufzeichnung der Transportwege im 30 sec-Intervall (Darstellung auf 2 min-Intervalle zusammengefasst). Links: CLSM-Aufnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Rechts: Tracking ausgewählter Fluoreszenzsignale. Mitte: *Merge* von links und rechts.

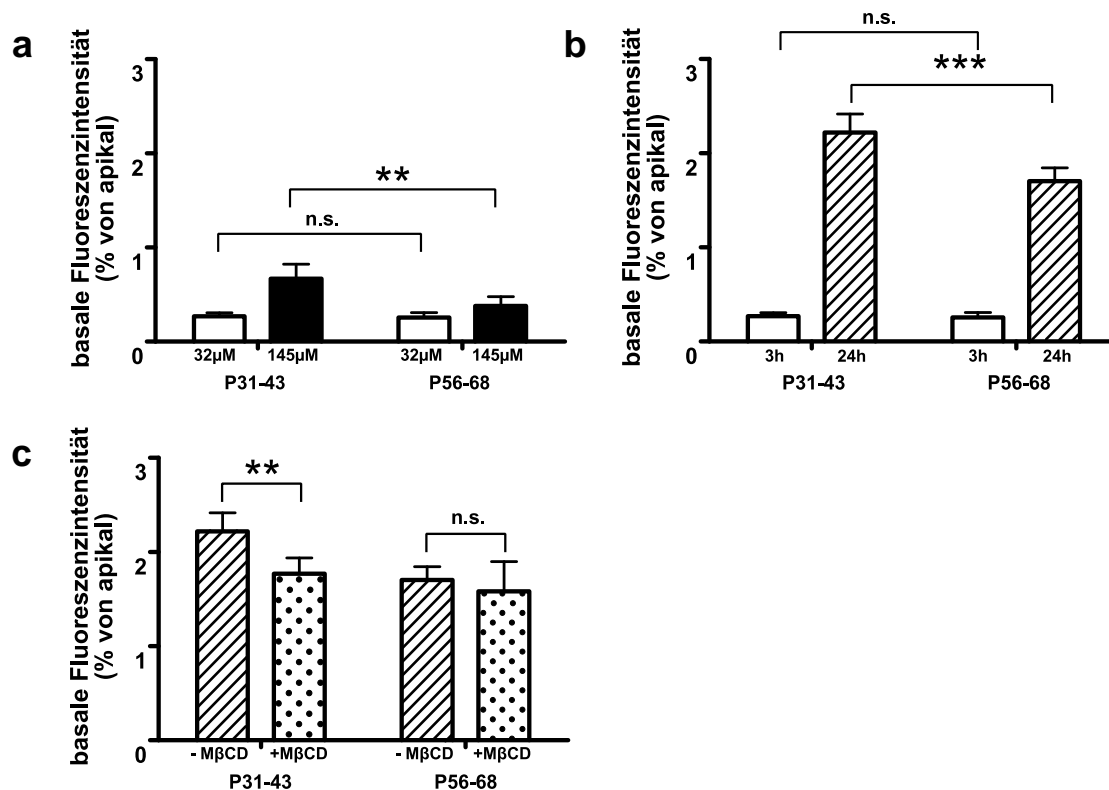


**Abb. 5-2: Transport von P56-68 in Caco-2-Zellen.** Inkubation von Caco-2-Zellen mit 70 µg/mL Liss-P56-68 über 30 min und nachfolgender Bildsequenzaufzeichnung der Transportwege im 30 sec-Intervall (Darstellung auf 2 min-Intervalle zusammengefasst). Links: CLSM-Aufnahme zu unterschiedlichen Zeitpunkten. Rechts: Tracking ausgewählter Fluoreszenzsignale. Mitte: *Merge* von links und rechts.

## **5.2 Transport fluoreszenzmarkierter Gliadinpeptide über Caco-2-Monolayer**

### **5.2.1 Translokation fluoreszenzmarkierter Gliadinpeptide**

Experimente zum transepithelialen Transport von Gliadinpeptiden legten nahe, dass die fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptide PF-P31-43 und PF-P56-68 ein intaktes Monolayer aus intestinalen Epithelzellen (Caco-2) überwinden können. Die fluorometrische Analyse des Zellmediums zeigte signifikant höhere basale Fluoreszenzintensitäten von Zellen die 3 h mit 145 µmol/L PF-P31-43 inkubiert wurden, verglichen mit Zellen, die mit einer äquimolaren Menge an PF-P56-68 inkubiert worden waren (0,7 % bzw. 0,4 % der apikalen Fluoreszenzintensität). Bei Monolayern, die über die gleiche Zeit, aber mit einer geringeren Konzentration an Gliadinpeptiden (32 µmol/L) inkubiert worden waren, zeigte sich eine geringere Fluoreszenzintensität im basalen Medium. Zwischen den beiden getesteten Peptiden konnte hierbei kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Translokation festgestellt werden (0,3 % der apikalen Fluoreszenzintensität für beide Peptide) (Abb. 5-3 a). Nach 24-stündiger Inkubation der Zellen mit den Peptiden in gleicher Konzentration konnten signifikante Unterschiede in der Fluoreszenzintensität gemessen werden. Die Fluoreszenzintensität im basalen Medium von Zellen, die mit PF-P31-43 inkubiert wurden, war höher verglichen mit der von Zellen, die mit PF-P56-68 inkubiert worden waren (2,2 bzw. 1,7 % der apikalen Fluoreszenzintensität). Für die 24-stündige Inkubation mit PF-P31-43 ergab sich eine 8,3-fach höhere Fluoreszenzintensität des basalen Mediums gegenüber der Inkubation über 3 h. Dagegen beträgt der Anstieg der Fluoreszenzintensität bei Inkubation mit P56-68 nur das 6,7-fache (Abb. 5-3 b). Der Einsatz von M $\beta$ CD als Endozytose-Inhibitor reduzierte die Translokation bei Zellen, die mit PF-P31-43 inkubiert worden waren, um ca. 20 %; für die Inkubation mit PF-P56-68 konnte kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (1,8 % bzw. 1,6 % der apikalen Fluoreszenzintensität) (Abb. 5-3 c).

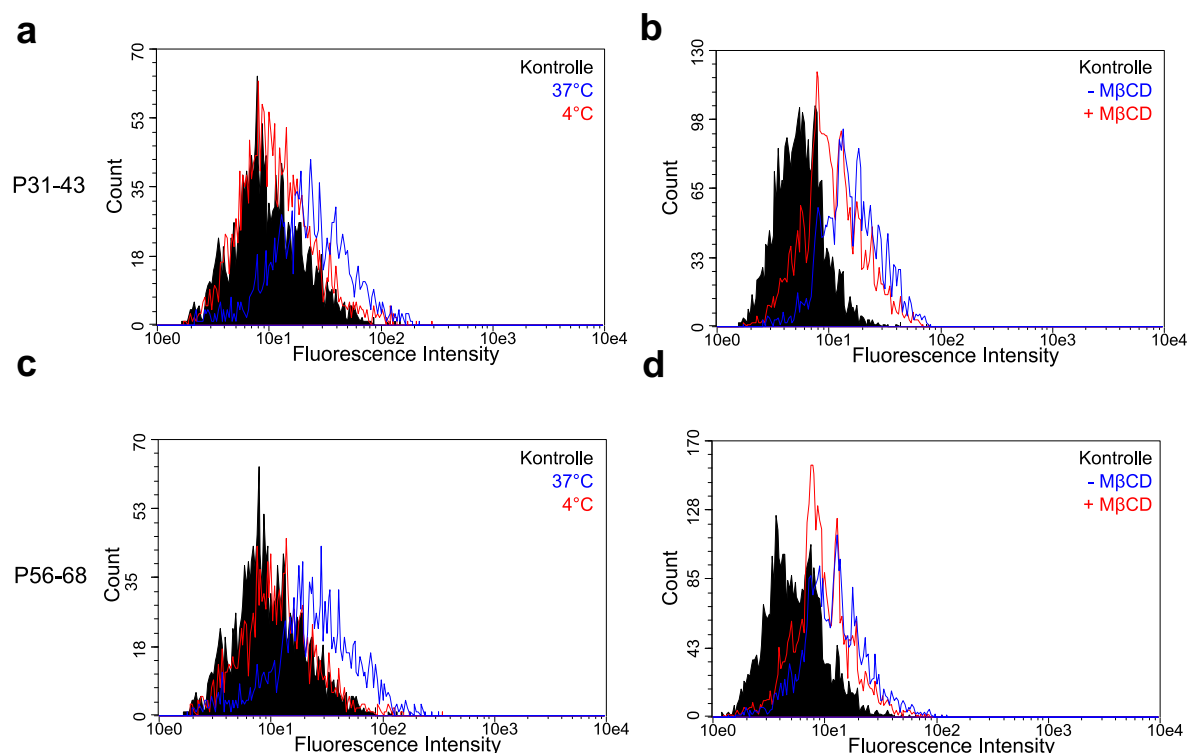


**Abb. 5-3: Fluorometrische Analyse der Translokation von Gliadinpeptiden über ein epitheliales Monolayer.** Fluorometrische Analyse des apikalen und basalen Zellmediums von Caco-2-Monolayern auf Translokation von fluoreszenz-markierten Gliadinpeptiden. (a) Fluoreszenzintensität des basalen Zellmediums nach 3 h Inkubation mit 145  $\mu$ mol/L bzw. 32  $\mu$ mol/L fluoreszenzmarkiertem PF-P31-43 und PF-P56-68. (b) Fluoreszenzintensität des basalen Zellmediums nach 3 h bzw. 24 h Inkubation mit 32  $\mu$ mol/L fluoreszenzmarkiertem PF-P31-43 und PF-P56-68. (c) Fluoreszenzintensität des basalen Zellmediums nach 24 h Inkubation mit 32  $\mu$ mol/L fluoreszenzmarkiertem PF-P31-43 und PF-P56-68 bei Zugabe von M $\beta$ CD. Fluoreszenzintensität in % basal von apikal. n.s. = nicht signifikant. Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  SD. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

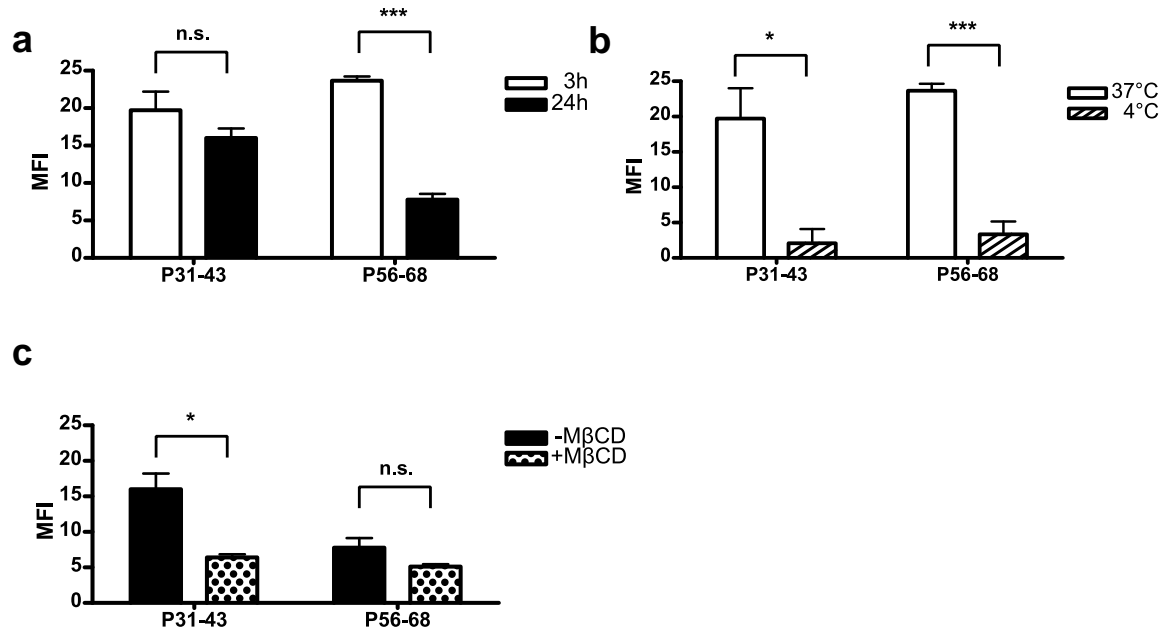
### 5.2.2 Zelluläre Aufnahme von Gliadinpeptiden

Analysen mittels Durchflusszytometrie und CLSM zeigten die intrazelluläre Aufnahme von fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden. Nach 3-stündiger Inkubation mit 32  $\mu$ mol/L PF-P31-43 und PF-P56-68 wurde ein Anstieg der zellassoziierten MFI beobachtet. Hierbei konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den mit unterschiedlichen Peptiden inkubierten Zellen beobachtet werden (Abb. 5-5 a). Zur Verifizierung aktiver Aufnahmeprozesse wurden Inkubationen bei 4 °C durchgeführt. Die durchflusszytometrischen Analysen der Zellen zeigten eine verminderte MFI bei beiden getesteten Peptiden (Abb. 5-4 a und c, Abb. 5-5 b). Bestätigt wurden diese Ergebnisse durch CLSM-Aufnahmen, die im Gegensatz zur Inkubation bei 37 °C nur wenige schwache Fluoreszenzsignale zeigten. Nach Inkubation bei 37 °C konnten fluoreszierende vesikuläre Strukturen im apikalen intrazellulären Bereich für beide getesteten Gliadinpeptide identifiziert werden (Abb. 5-6 a und b). Die Inkubation von

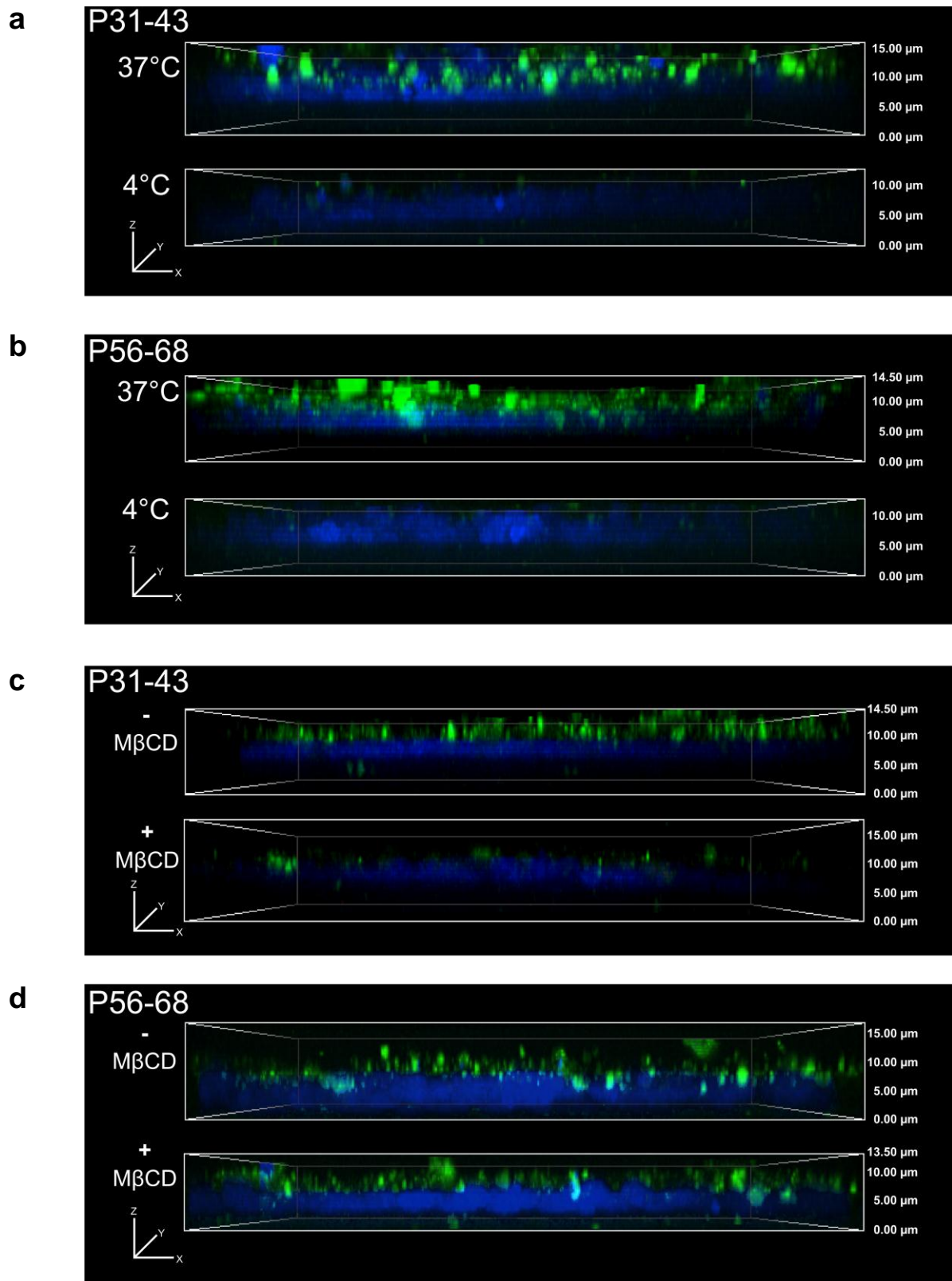
Caco-2-Zellen mit PF-P56-68 über 24 h führte zu einer verminderten MFI verglichen mit Versuchen über 3 h. Im Gegensatz dazu konnten bezogen auf die Inkubationszeiten keine signifikanten Unterschiede der MFI bei einer Inkubation mit PF-P31-43 festgestellt werden (Abb. 5-5 a). Der Einsatz von M $\beta$ CD als Endozytosehemmer zeigte eine reduzierte MFI für Zellen, die mit PF-P31-43 über 24 h inkubiert worden waren. Die MFI von Zellen, die mit PF-P56-68 inkubiert wurden, konnte durch Verwendung von M $\beta$ CD nicht weiter vermindert werden (Abb. 5-4 c und d, Abb. 5-5 c). Dies bestätigte sich auch durch die CLSM-Analyse (Abb. 5-6 c und d).



**Abb. 5-4: Durchflusszytometrische Analyse der intrazellulären Aufnahme von Gliadinpeptiden.** Durchflusszytometrische Analyse von Caco-2-Zellen nach 3 h Inkubation mit PF-P31-43 und PF-P56-68 bei 37 °C und 4 °C, nach 24 h Inkubation mit PF-P31-43 und PF-P56-68 mit (+M $\beta$ CD) und ohne (-M $\beta$ CD) Zugabe von M $\beta$ CD als Endozytosehemmer.



**Abb. 5-5: Vergleich der zellulären Aufnahme von Gliadinpeptiden.** Vergleich der MFI von Caco-2-Zellen nach 3 h bzw. 24 h Inkubation mit PF-P31-43 und PF-P56-68 (a), nach 3 h Inkubation mit PF-P31-43 und PF-P56-68 bei 37 °C bzw. 4 °C (b) und nach 24 h Inkubation mit PF-P31-43 und PF-P56-68 mit (+MβCD) und ohne (-MβCD) MβCD als Endozytosehemmer (c). n.s. = nicht signifikant. Ergebnisse als Mittelwerte ± SD. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,005$ .

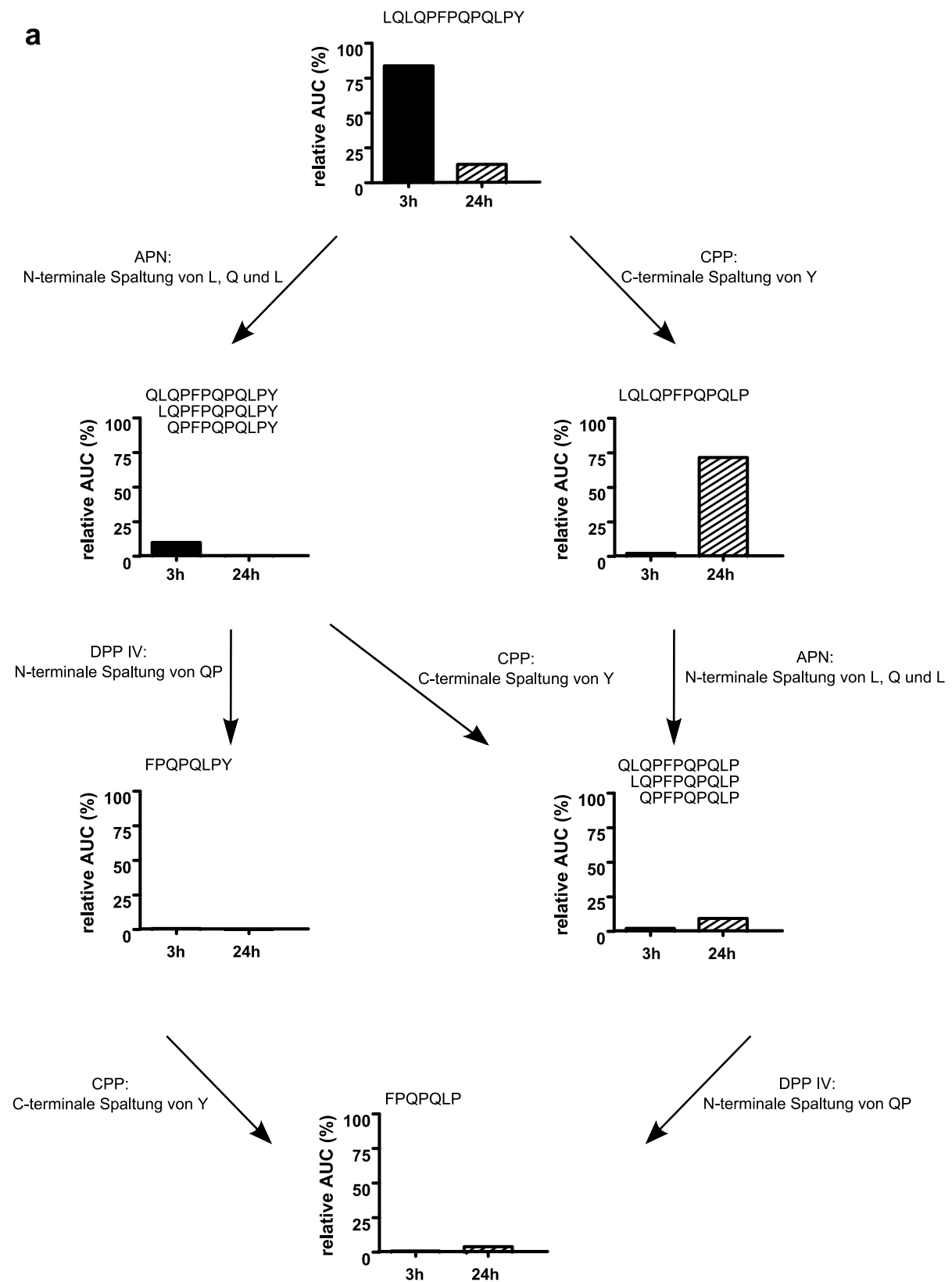


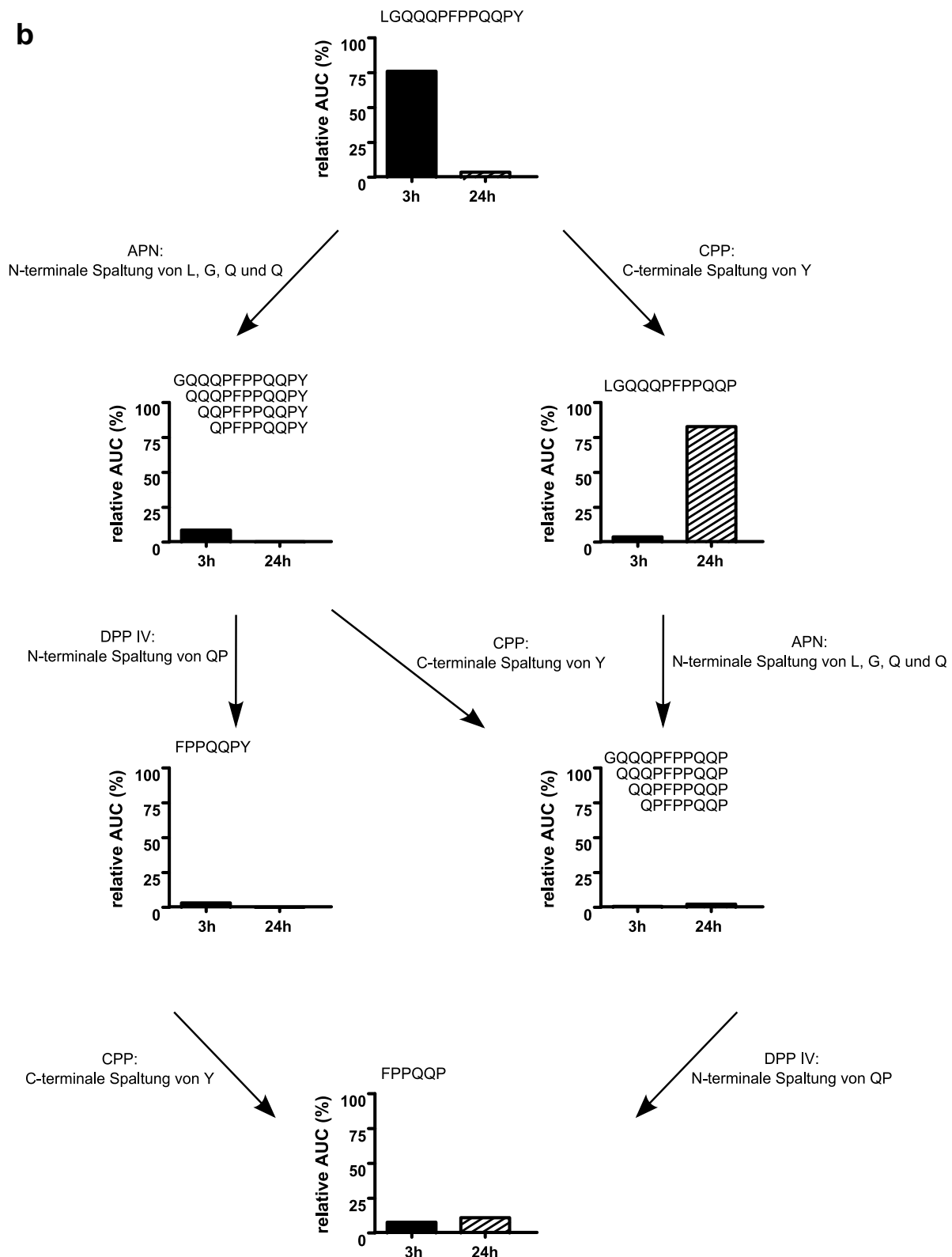
**Abb. 5-6: CLSM-Analyse der zellulären Aufnahme von Gliadinpeptiden.** CLSM-Aufnahmen von Caco-2-Zellen nach 3-stündiger Inkubation mit PF-P31-43 (a) und PF-P56-68 (b) bei 37 °C und 4 °C bzw. nach 24-stündiger Inkubation mit PF-P31-43 (c) und PF-P56-68 (d) mit und ohne M $\beta$ CD als Endozytosehemmer. Dargestellt ist eine dreidimensionale Aufnahme von der Seitenansicht mit Färbung der Zellkerne in blau und der Fluoreszenzmarkierung in grün.

### 5.2.3 Abbau von P31-43 und P56-68 durch Caco-2-Zellen

Zur Klärung, ob es sich bei der durch fluorometrische Analyse gezeigten Translokation über Caco-2-Monolayer um intakte Gliadinpeptide handelt oder ob ein Abbau derselben stattgefunden hat, wurden massenspektrometrische Analysen durchgeführt. Dafür wurde das apikale und basale Medium von Zellen untersucht, die über 3 h bzw. 24 h mit 32 µmol/L PF-P31-43 bzw. PF-P56-68 inkubiert worden waren. Durch den Einsatz von MALDI-TOF-MS konnte gezeigt werden, dass die eingesetzten fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptide bereits auf der apikalen Seite des Caco-2-Monolayers gespalten werden können. Basierend auf dem MS-Profil und den bekannten Affinitäten von Peptidasen, die auf der Bürstensaummembran von intestinalen Epithelzellen einschließlich Caco-2 Zellen lokalisiert sind, wurde der potenzielle Degradationsweg rekonstruiert. Dabei wurden sowohl PF-markierte als auch unmarkierte Peptide miteinbezogen, die im Folgenden durch die Bezeichnung des Peptids zusammengefasst werden. Durch die MALDI-TOF-MS-Analyse wurde gezeigt, dass der Hauptanteil von P56-68 (84 %) und P31-43 (76 %) im apikalen Kompartiment nach 3 h Inkubationszeit noch intakt ist. Nach 24 h Inkubationszeit wurde sowohl bei P31-43 (72 %) als auch bei P56-68 (83 %) die Abspaltung der C-terminalen Aminosäure Tyrosin beobachtet. Katalysiert wurde die Hydrolyse möglicherweise durch Carboxypeptidase P (CPP). Auch wurden nach 3-stündiger Inkubationszeit eine Abspaltung der drei N-terminalen Aminosäuren Lysin, Glutamin und Lysin von P56-68 gezeigt. Von allen identifizierten Sequenzen, die sich durch eine Hydrolyse mittels enterozytären Enzymen erklären lassen, machte der Anteil dieser N-terminalen Abspaltungen 10 % aus. Dies impliziert die Beteiligung von Aminopeptidase N (APN). Die so entstandenen Sequenzen trugen bei einer Inkubationszeit von 24 h nur geringfügig zu den identifizierten Peptiden bei. Bei Inkubation von P31-43 über 3 h zeigte sich die N-terminale Abspaltung von vier Aminosäuren (Lysin, Glycin, Glutamin und Glutamin) (insgesamt 9 %) was auch hier die Aktivität der APN nahelegt. Nach 24 h scheinen auch diese, nach 3 h entstandenen Sequenzen zu einem Großteil abgebaut worden zu sein. Weitere Fragmente, die als Spaltprodukte aus einer enzymatischen Degradation durch Dipeptidylpeptidase IV (DPP IV), CPP und APN in Frage kommen, konnten ebenfalls mit geringen Anteilen nach 3 h und 24 h Inkubationszeit identifiziert werden. Der Einsatz von MßCD zeigte keinen deutlichen Einfluss auf die Degradation und die identifizierten Spaltprodukte (Abb. 5-7).





**b**

**Abb. 5-7: Abbau von P31-43 und P56-68 durch Caco-2-Zellen.** MS-Analyse der Abbauprodukte von P56-68 (LQLQPFPPQQLPY) (a) und P31-43 (LGQQQPFPPQQPY) (b) auf der apikalen Seite von Caco-2-Monolayern. Inkubation der Zellen mit 32  $\mu\text{mol/L}$  des jeweiligen Gliadinpeptids. Jedes Experiment (3 und 24 h  $\pm$  M $\beta$ CD) wurde dreimal wiederholt. Die Quantifizierung der Peptide erfolgte durch Ermittlung der relativen AUC, basierend auf den identifizierten, durch enzymatische Hydrolyse erklärbaren Peptiden [71]. Angabe der Werte als Mittelwerte.

Die Analyse des basalen Mediums zeigte nach 3 h Inkubationszeit keine Translokation des intakten P56-68 oder Fragmente dieses Peptids. Nach 24 h

Inkubationszeit konnte eine Translokation von intaktem P56-68 in einem von drei Experimenten nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde in allen drei Wiederholungen das Fragment LQLQFPFPQQLP gefunden, was auf eine Abspaltung des C-terminalen Tyrosins durch CPP zurückgeführt werden kann. Produkte, die aus der Hydrolyse durch CPP entstanden sind, ließen sich auch im basalen Medium von Zellen nachweisen, die mit P31-43 inkubiert wurden. Das Fragment LGQQQPFPPQQP konnte bei allen Wiederholungen des Experiments sowohl nach 3 h als auch nach 24 h Inkubation nachgewiesen werden. Auch das intakte Peptid konnte bei 2 von 3 Wiederholungen im basalen Medium von Zellen, die 3 h mit P31-43 inkubiert wurden, identifiziert werden. Bei 24-stündiger Inkubation erfolgte der Nachweis in einer Wiederholung (Tab. 5-1). Des Weiteren wurden kleinere Spaltprodukte von beiden Peptiden für beide Inkubationszeiten im basalen Medium nachgewiesen.

**Tab. 5-1: Translokation von Gliadinpeptiden.** Identifikation von intakten oder C-terminal gespaltenen Gliadinpeptiden im basalen Medium von Caco-2-Monolayern. Alle Experimente wurden dreimal wiederholt. n= Anzahl von Experimenten die positiv für das Peptid waren.

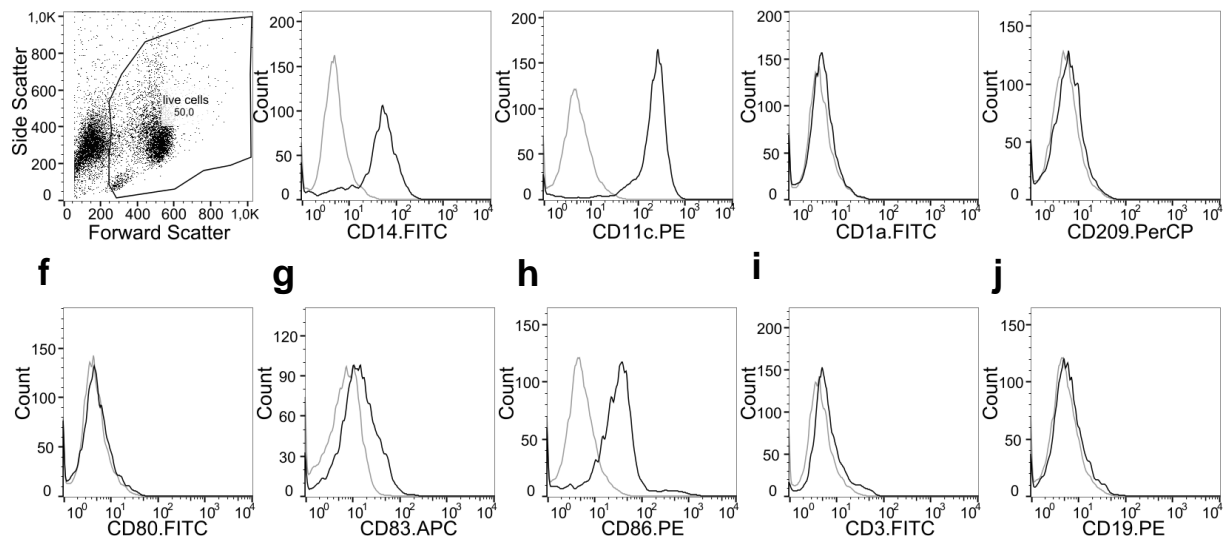
Inkubationszeit	P31-43	Identifiziert in n/3 Experimenten	P56-68	Identifiziert in n/3 Experimenten
3 h	LGQQQPFPPQQPY	2	LQLQFPFPQQLPY	-
	LGQQQPFPPQQP	3	LQLQFPFPQQLP	-
24 h	LGQQQPFPPQQPY	1	LQLQFPFPQQLPY	1
	LGQQQPFPPQQP	3	LQLQFPFPQQLP	3
24 h + MβCD	LGQQQPFPPQQPY	1	LQLQFPFPQQLPY	1
	LGQQQPFPPQQP	3	LQLQFPFPQQLP	3

### 5.3 Einfluss von Gluten und Gliadinpeptiden auf die Reifung von dendritischen Zellen

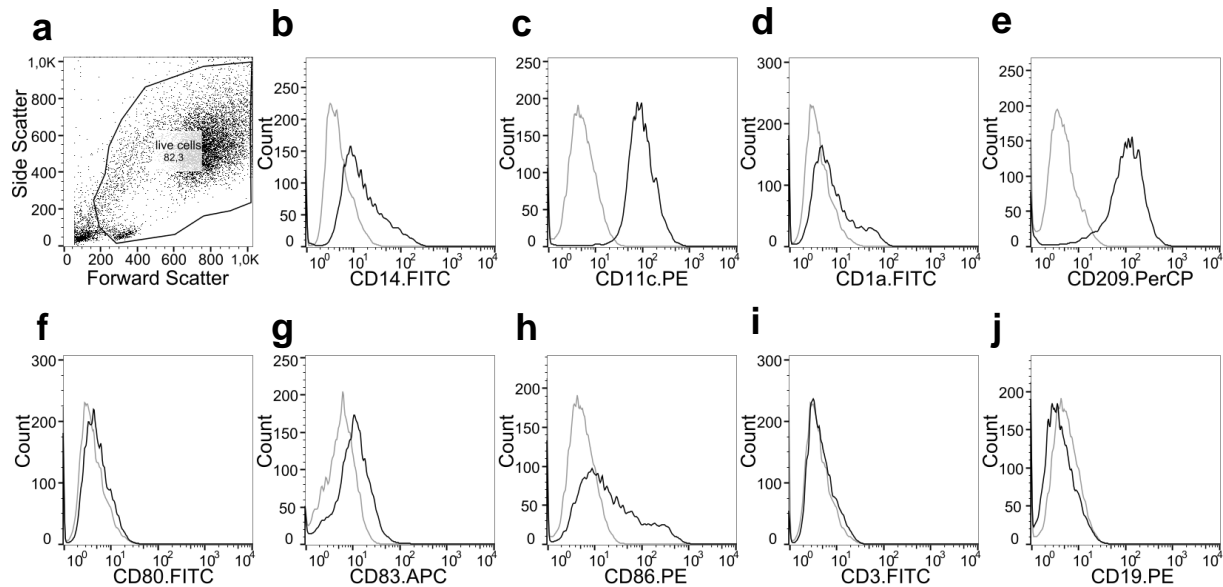
Zur Untersuchung des Einflusses von spezifischen Gliadinpeptiden auf die Reifung von iDC wurden diese mit synthetisch hergestellten Gliadinpeptiden (P31-43 und P56-68) sowie dem basalen Zellkulturmedium aus dem Versuchen zum Transport von Gliadinpeptiden (siehe Abschnitt 5.2) inkubiert. Als Positivkontrolle wurden iDC mit LPS inkubiert.

Zuvor wurden der Phänotyp der isolierten Monozyten sowie der daraus gereiften iDC mittels Durchflusszytometrie bestimmt (Abb. 5-8 und Abb. 5-9). Durch Messung der

CD3 und CD19 Oberflächenexpression wurden Kontaminationen durch T- bzw. B-Zellen ermittelt. Bei den durchgeführten Versuchen lagen die Kontaminationen der isolierten Monozyten mit T- bzw. B-Zellen unter 5 %. Sowohl mikroskopisch als auch anhand des *Forward* und *Side Scatters* (Abb. 5-8 a) ließ sich ein Größenwachstum, sowie die Umwandlung von einer für Monozyten typischen runden in eine für DC charakteristische tropfenförmige Form erkennen. Zur weiteren phänotypischen Beurteilung wurde die Expression verschiedener Oberflächenmarker analysiert. Hierbei zeigten sich nach Inkubation mit GM-CFS und IL-4 eine Abnahme von CD14 sowie eine Zunahme von CD1a, CD86 und CD209, was dem Phänotyp von iDC entspricht.



**Abb. 5-8: Durchflusszytometrische Analyse von Oberflächenmarkern auf Monozyten.** (a) Beurteilung des Volumens und der Granularität der Zelle anhand *Forward* und *Side Scatter*. Die Zunahme des *Forward Scatters* entspricht einem Größenwachstum, die Zunahme des *Side Scatters* entspricht einer gesteigerten Granularität. Analyse der Oberflächenexpression von (b) CD14, (c) CD11c, (d) CD1a, (e) CD209, (f) CD80, (g) CD83, (h) CD86, (i) CD3 und (j) CD19 (schwarze Linie) der lebenden Zellen (siehe Eingrenzung *live cells*). Darstellung der Isotypenkontrolle in grau.



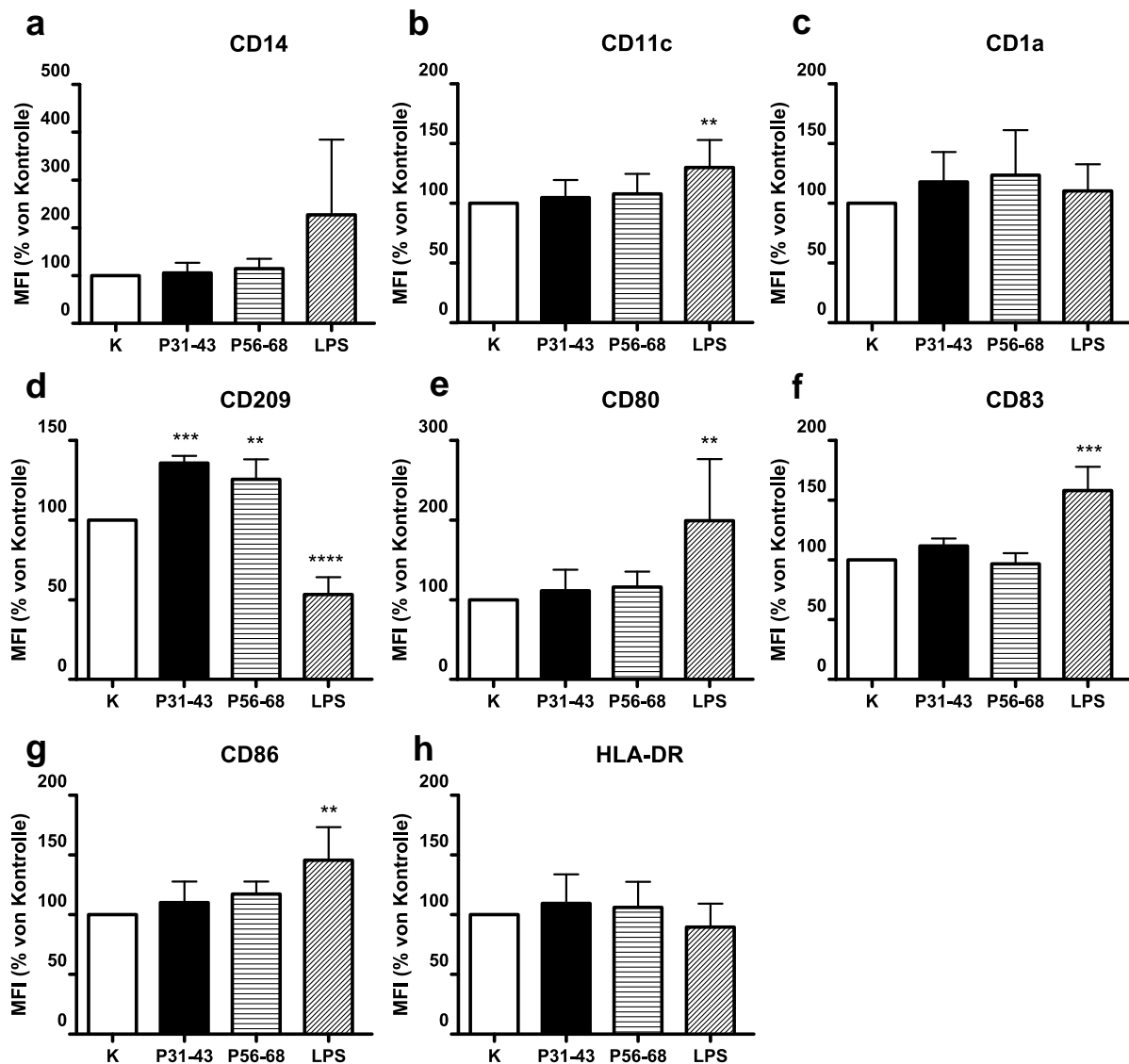
**Abb. 5-9: Durchflusszytometrische Analyse von Reifungsmarkern auf iDC.** (a) Beurteilung des Volumens und der Granularität der Zelle anhand *Forward* und *Side Scatter*. Die Zunahme des *Forward Scatters* entspricht einem Größenwachstum, die Zunahme des *Side Scatters* entspricht einer gesteigerten Granularität. Analyse der Oberflächenexpression von (b) CD14, (c) CD11c, (d) CD1a, (e) CD209, (f) CD80, (g) CD83, (h) CD86, (i) CD3 und (j) CD19 (schwarze Linie) der lebenden Zellen (siehe Eingrenzung *live cells*). Darstellung der Isotypenkontrolle in grau.

Die auf diese Weise erzeugten iDC wurden mit LPS, den Gliadinpeptiden P31-43 und P56-68 sowie dem basalen Zellkulturmedium aus den Versuchen zum Transport von Gliadinpeptiden inkubiert.

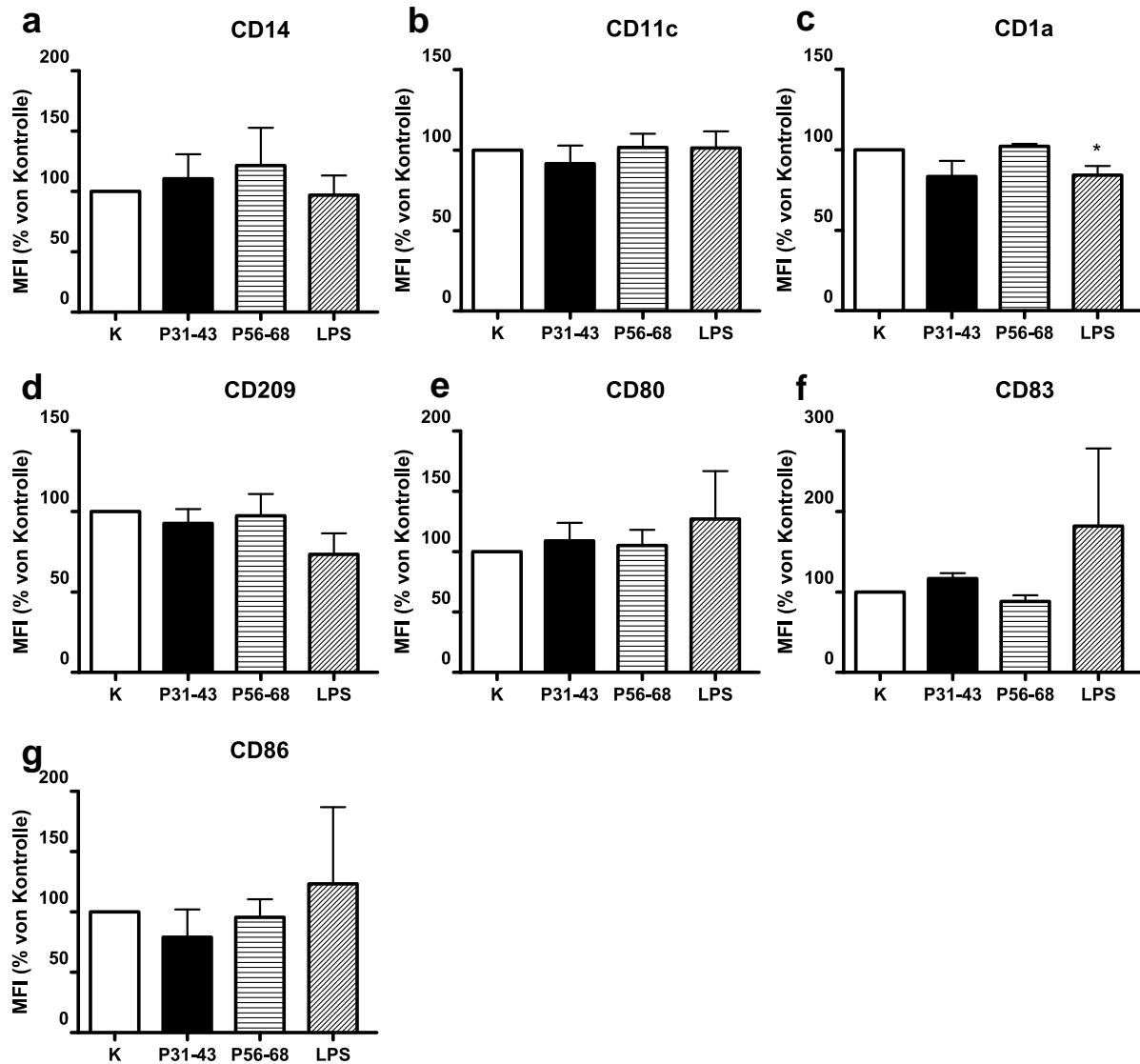
Die Untersuchung mittels Durchflusszytometrie zeigte bei einer Inkubation über 24 h in iDC-Inkubationsmedium, dass LPS zu einem signifikanten Anstieg der Oberflächenexpression von CD11c, CD80, CD83 und CD86 auf iDC führte. Für die Inkubation mit P31-43 und P56-68 konnte keine signifikante Veränderung der Expression dieser Oberflächenmoleküle beobachtet werden. Die Oberflächenexpression von CD209 hingegen wurde durch P31-43 und P56-68 signifikant gesteigert, wobei P31-43 zum höchsten Anstieg führte. Dagegen wurde die Oberflächenexpression von CD209 durch LPS signifikant reduziert. Für die Expression von CD14, CD1a und HLA-DR ergaben sich keine signifikanten Änderungen (Abb. 5-10).

Wurden die Zellen allerdings über 24 h in HBSS statt in iDC-Medium inkubiert, zeigte sich, dass LPS zu einer signifikant verringerten Oberflächenexpression von CD1a führte und sonst keinen Einfluss auch die Expression der gemessenen Oberflächenmoleküle hatte. P31-43 und P56-68 hatte auf keines der gemessenen Oberflächenmoleküle einen Einfluss (Abb. 5-11).

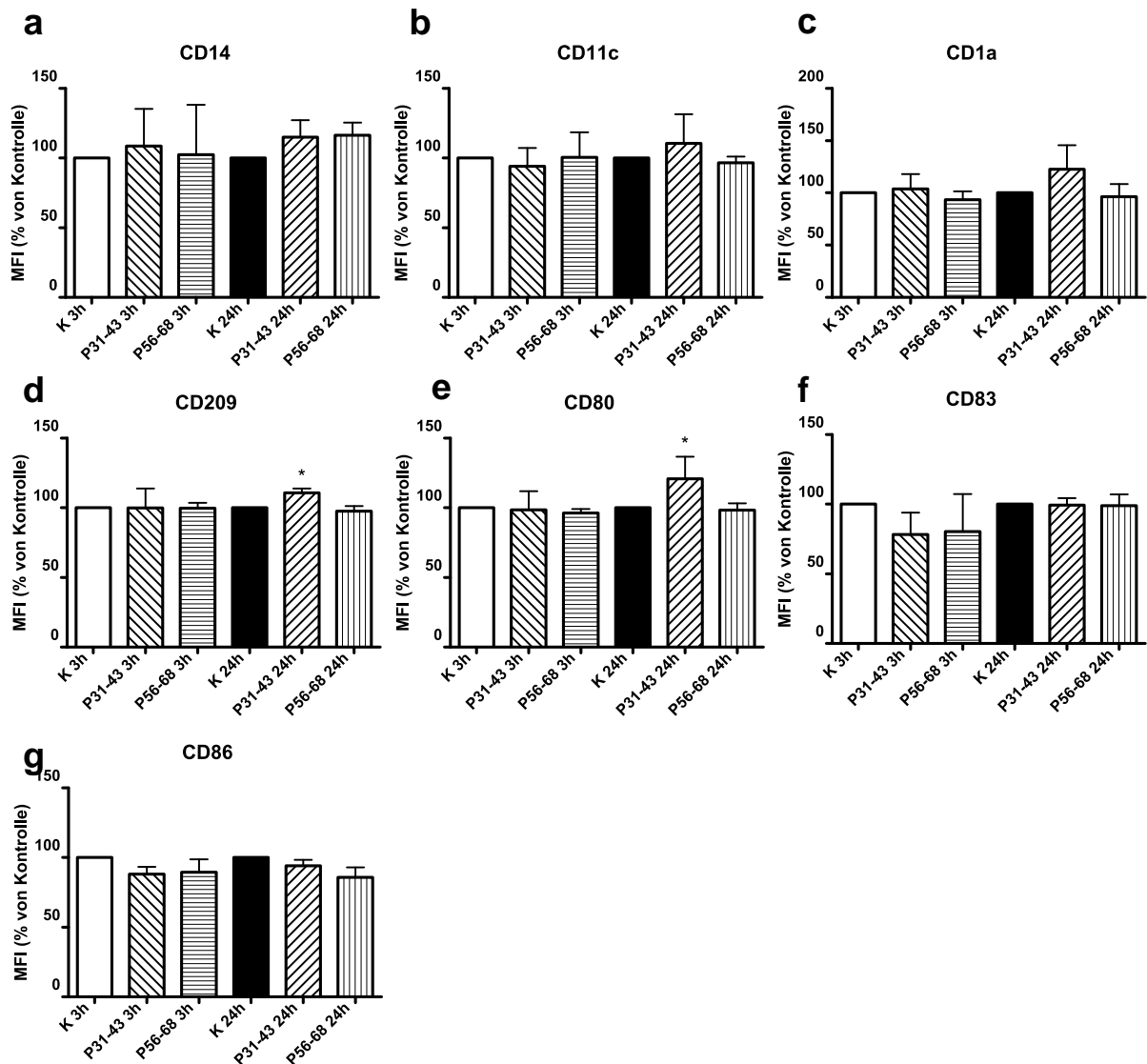
Signifikante Veränderungen konnten bei der Inkubation mit dem basalen Zellmedium aus dem Versuch zum Transport von Gliadinpeptiden nur durch das basale Medium der Zellen induziert werden, die 24 h mit fluoreszenzmarkiertem P31-43 in HBSS inkubiert wurden. Hier zeigte sich eine signifikant höhere Oberflächenexpression von CD209 und CD80 (Abb. 5-12).



**Abb. 5-10: Durchflusszytometrische Analyse von iDC nach 24 h Inkubation mit P31-43, P56-68 und LPS in iDC-Inkubationsmedium.** Messung von (a) CD14, (b) CD11c, (c) CD1a, (d) CD209, (e) CD80, (f) CD83, (g) CD86 und (h) HLA-DR. Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  SD. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  verglichen mit Kontrolle (als 100 % gesetzt).



**Abb. 5-11: Durchflusszytometrische Analyse von iDC nach 24 h Inkubation mit P31-43, P56-68 und LPS in HBSS.** Messung von (a) CD14, (b) CD11c, (c) CD1a, (d) CD209, (e) CD80, (f) CD86, (g) CD86 und (h) HLA-DR. Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  verglichen mit Kontrolle (als 100 % gesetzt).



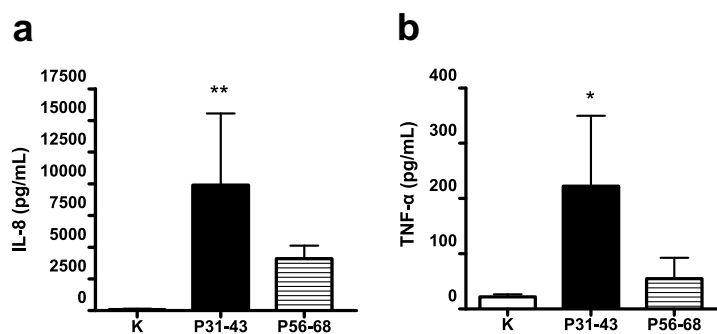
**Abb. 5-12: Durchflusszytometrische Analyse von iDC nach 24 h Inkubation mit dem basalen Inkubationsmedium aus Versuchen zum Transport fluoreszenzmarkierter Gliadinpeptide über Caco-2-Monolayer.** Die basalen Inkubationsmedien wurden aus folgenden Inkubationsversuchen verwendet: 3 h Inkubation mit HBSS (Kontrolle) (K 3 h), 3 h Inkubation mit P31-43 in HBSS (P31-43 3 h), 3 h Inkubation mit P56-68 in HBSS (P56-68 3 h), 24 h Inkubation mit HBSS (Kontrolle) (K 24 h), 24 h Inkubation mit P31-43 in HBSS (P31-43 24 h), 24 h Inkubation mit P56-68 in HBSS (P56-68 24 h). Messung von (a) CD14, (b) CD11c, (c) CD1a, (d) CD209, (e) CD80, (f) CD83, (g) CD86 und (h) HLA-DR. Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$  verglichen mit jeweiliger Kontrolle (als 100 % gesetzt).

Die Analyse mittels ELISA zeigte bei iDC, die 24 h mit P31-43 in iDC-Inkubationsmedium inkubiert wurden, einen signifikanten Anstieg der IL-8- und TNF- $\alpha$ -Sekretion. Diesbezüglich konnte für P56-68 keine signifikante Veränderung nachgewiesen werden (Abb. 5-13). Die Inkubation mit LPS in iDC-Inkubationsmedium führte zu einem starken Anstieg der IL-8- und TNF- $\alpha$ -Sekretion, die aufgrund der hohen Konzentration außerhalb des Messbereichs des ELISA Readers lagen (ohne Abbildung).

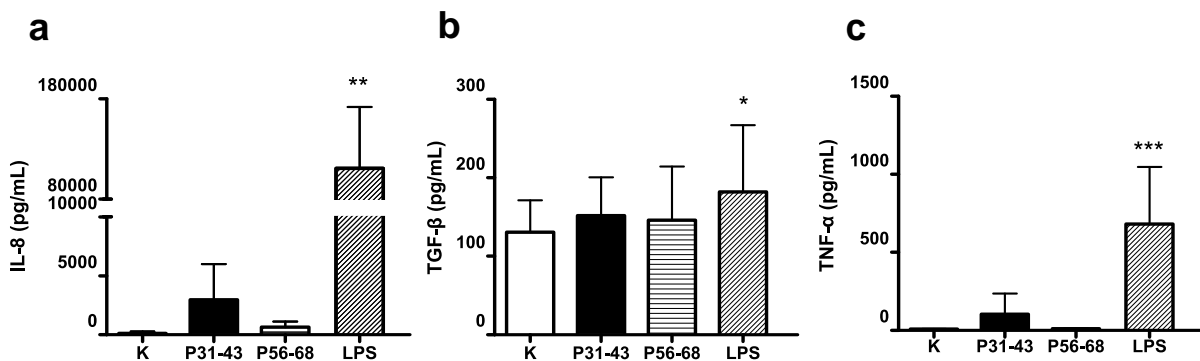


Die Inkubation von iDC in HBSS dagegen führte zwar ebenfalls mit LPS, nicht aber mit den Gliadinpeptiden, zu einem messbaren, signifikanten Anstieg der IL-8- und TNF- $\alpha$ -Sekretion. Die für HBSS-inkubierte iDC gemessene TGF- $\beta$ -Sekretion zeigte für LPS einen signifikanten Anstieg, während P31-43 und P56-68 zu keiner signifikanten Veränderung führten (Abb. 5-14).

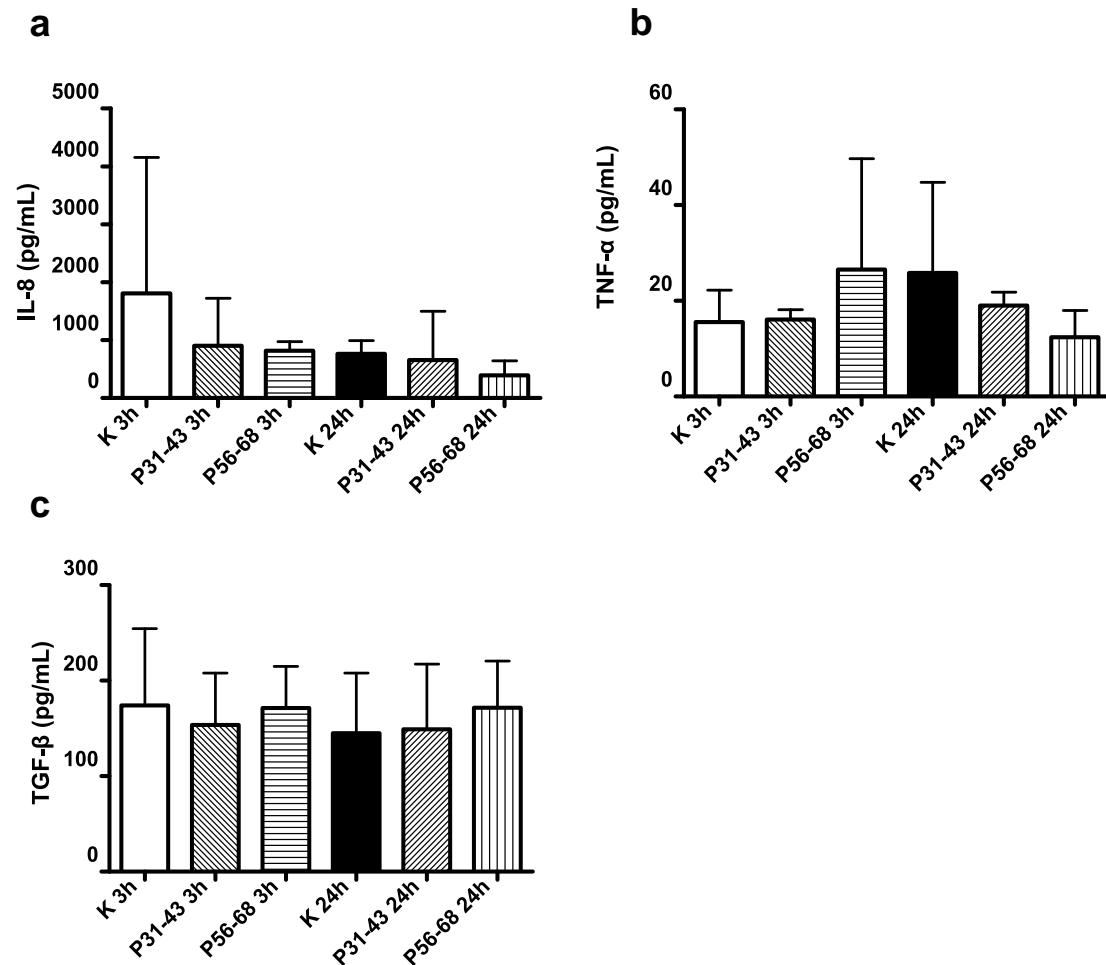
Die Inkubation von iDC mit dem basalen Zellmedium aus den Versuchen zum Transport fluoreszenzmarkierter Gliadinpeptide über Caco-2-Monolayer (siehe Abschnitt 5.2) führte zu keiner signifikanten Veränderung der IL-8-, TNF- $\alpha$ - oder TGF- $\beta$ -Sekretion (Abb. 5-15).



**Abb. 5-13: Beeinflussung der Zytokin-Sekretion (in pg/mL) von iDC nach 24 h in iDC-Inkubationsmedium.** Einfluss der Inkubation von iDC mit P31-43 und P56-68 in iDC-Inkubationsmedium über 24 h auf die Sekretion von (a) IL-8 und (b) TNF- $\alpha$ . Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  SD. \*p<0,05, \*\*p<0,01 verglichen mit Kontrolle.



**Abb. 5-14: Beeinflussung der Zytokin-Sekretion (in pg/mL) von iDC nach 24 h in HBSS.** Einfluss der Inkubation von iDC mit P31-43, P56-68 und LPS in HBSS über 24 h auf die Sekretion von (a) IL-8, (b) TNF- $\alpha$  und (c) TGF- $\beta$ . Ergebnisse als Mittelwerte  $\pm$  SD. \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001.



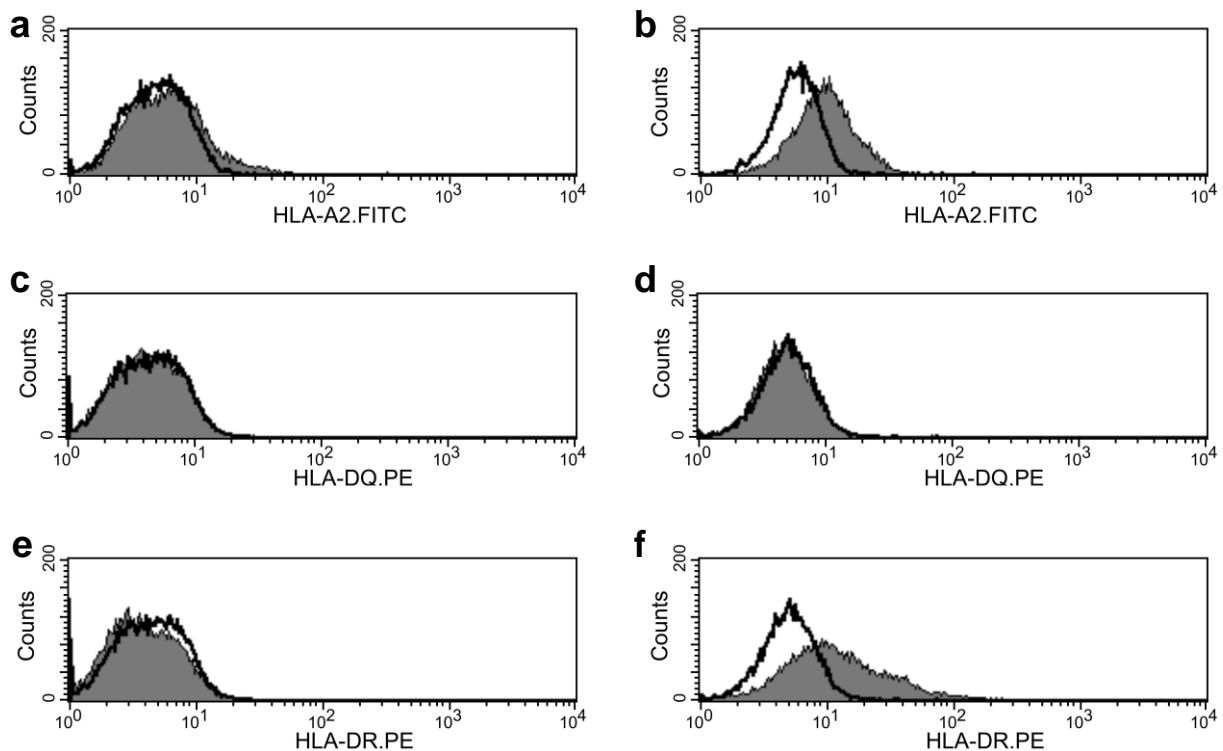
**Abb. 5-15: Beeinflussung der Zytokin-Sekretion (in pg/mL) von iDC nach 24 h in basalem Zellkulturmedium.** Einfluss der Inkubation von iDC mit dem basalem Medium aus den Versuchen zum Transport fluoreszenzmarkierter Gliadinpeptide über Caco-2-Monolayer über 24 h auf die Sekretion von (a) IL-8, (b) TNF-α und (c) TGF-β. Ergebnisse als Mittelwerte ± SD.

## 5.4 Analyse der Expression von HLA-Molekülen auf Caco-2- und HT-29-Zellen

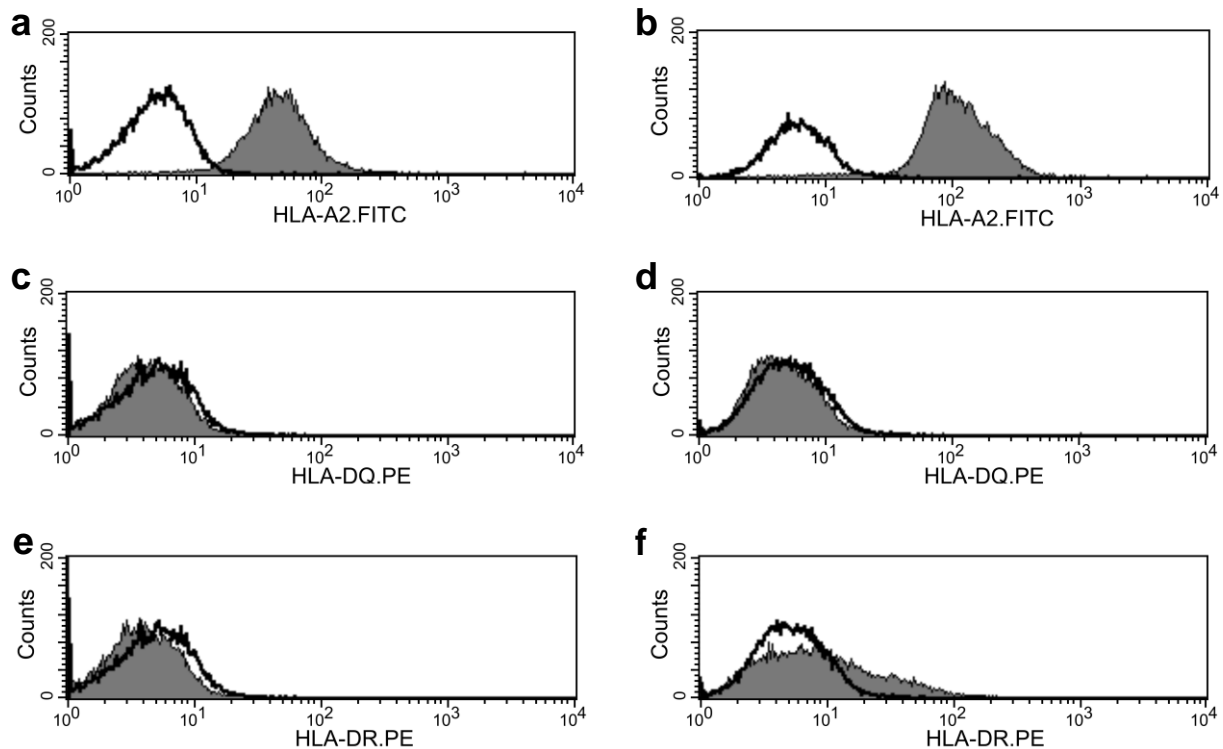
Für die Analyse der HLA-Klasse-I (HLA-A2 bzw. HLA-ABC), HLA-DQ und HLA-DR Expression auf HT-29- und Caco-2-Zellen wurden präkonfluente Zellen verwendet. Neben einer unbehandelten Kontrolle wurden die Zellen mit IFN-γ, P31-43 oder P56-68 über 24 h inkubiert.

Während die durchflusszytometrische Analyse auf unbehandelten HT-29-Zellen eine geringe Oberflächenexpression von HLA-A2 zeigte, wurden HLA-DQ und HLA-DR nicht exprimiert (Abb. 5-16 a, c und e). Dagegen zeigte eine Inkubation mit IFN-γ über 24 h eine Steigerung der HLA-A2 und HLA-DR, aber nicht der HLA-DQ Expression auf HT-29-Zellen (Abb. 5-16 b, d und f).

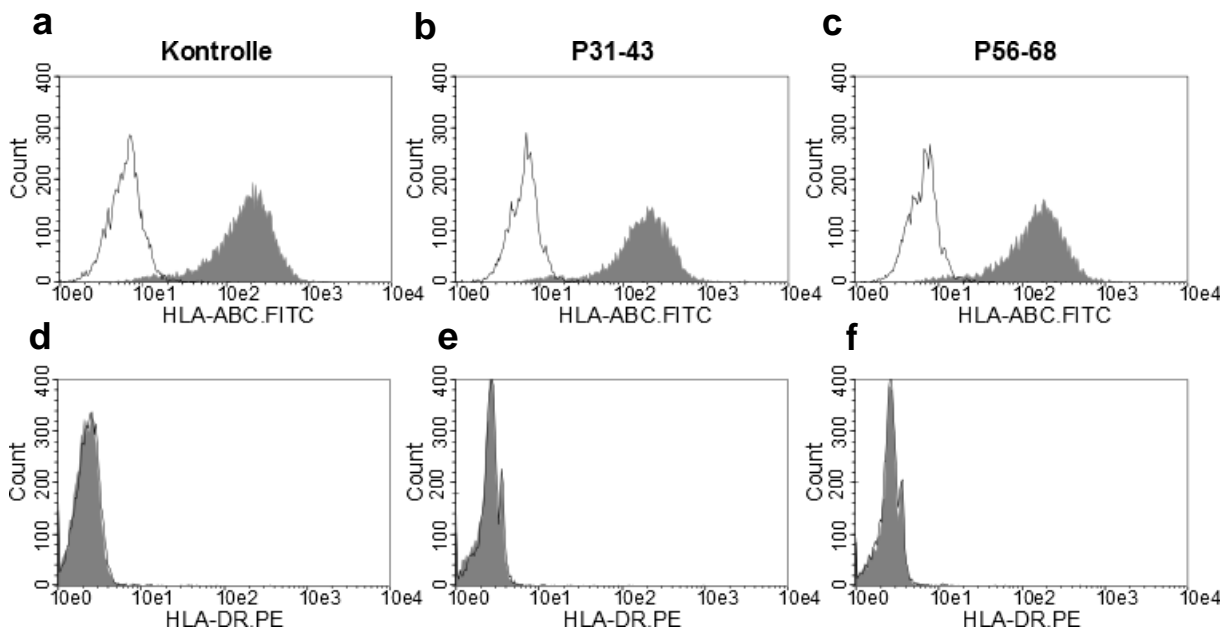
Auf unbehandelten Caco-2-Zellen wurde eine hohe Oberflächenexpression von HLA-A2, nicht aber von HLA-DQ oder HLA-DR beobachtet (Abb. 5-17 a, c und e). Eine 24-stündige Behandlung der Zellen mit IFN- $\gamma$  führte hier zu einer Steigerung der HLA-A2 und HLA-DR-Expression, nicht aber von HLA-DQ (Abb. 5-17 b, d und f). Die Inkubation von HT-29-Zellen mit Gliadinpeptiden zeigte im Vergleich zur Kontrolle weder für P31-43 noch für P56-68 eine Steigerung der HLA-ABC- oder HLA-DR-Oberflächenexpression (Abb. 5-18).



**Abb. 5-16: Oberflächenexpression von HLA-Molekülen auf HT-29-Zellen.** Inkubation von HT-29-Zellen (b + d + f) mit und (a + c + e) ohne IFN- $\gamma$  (500 U/mL) über 24 h. Messung der Oberflächenexpression von (a + b) HLA-A2, (c + d) HLA-DQ und (e + f) HLA-DR. Abbildung der Antikörperfärbung grau hinterlegt, Isotypenkontrolle schwarz.



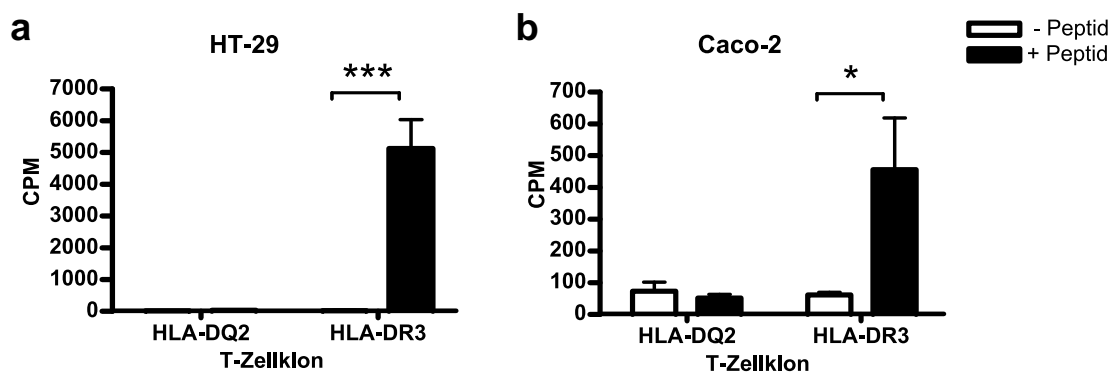
**Abb. 5-17: Oberflächenexpression von HLA-Molekülen auf Caco-2-Zellen.** Inkubation von Caco-2-Zellen (b + d + f) mit und (a + c + e) ohne IFN- $\gamma$  (500 U/mL) über 24 h. Messung der Oberflächenexpression von (a + b) HLA-A2, (c + d) HLA-DQ und (e + f) HLA-DR. Abbildung der Antikörperfärbung grau hinterlegt, Isotypenkontrolle schwarz.



**Abb. 5-18: Beeinflussung der Oberflächenexpression von HLA-Molekülen durch Inkubation mit Gliadinpeptiden.** Inkubation von HT-29-Zellen mit (b + e) P31-43 bzw. (c + f) P56-68 (je 100  $\mu$ g/mL) und (a + d) ohne Gliadinpeptide (Kontrolle) über 24 h. Messung der Oberflächenexpression von (a - c) HLA-ABC und (d - f) HLA-DR. Abbildung der Antikörperfärbung grau hinterlegt, Isotypenkontrolle schwarz.

## 5.5 T-Zell-Proliferationsassay

Für die Untersuchung der Antigenpräsentation über HLA-Moleküle und der daraus folgenden Interaktion und Proliferation von antigenspezifischen T-Zellen wurden präkonfluente Caco-2- und HT-29-Zellen als APZ eingesetzt. Entsprechend der verschiedenen HLA-Moleküle wurden unterschiedliche Peptide und T-Zell-Klone verwendet. Zur Überprüfung der Interaktion mit HLA-DQ2 wurde der HLA-DQ2-spezifische T-Zell-Klon N10 mit dem für diesen Klon spezifischen Gliadinpeptid Gli $\alpha$ 9 (LQPFQPELPYPQ) eingesetzt. Zur Untersuchung der Interaktion mit HLA-DR wurde ein HLA-DR-spezifischer T-Zell-Klon gegen *Mycobacterium tuberculosis* mit dem für diesen Klon spezifischen Peptid 1113.47 (KTIAYDEEARRGL) verwendet.



**Abb. 5-19: T-Zell-Proliferationsassay.** Proliferation der T-Zell-Klone durch Interaktion mit (a) HT-29- und (b) Caco-2-Zellen. T-Zell-Klone: HLA-DQ2: N10 (Peptid: Gli $\alpha$ 9), HLA-DR3: *Mycobacterium tuberculosis* (Peptid: 1113.47); CPM: counts per million. MW  $\pm$  SD. \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ .

Wie in Abb. 5-19 dargestellt, lässt sich bei beiden Zelllinien keine Interaktion der entsprechenden T-Zell-Klone mit HLA-DQ2-präsentierten Antigenen ableiten. Im Gegensatz dazu ist bei beiden Zelllinien ein signifikanter Anstieg der T-Zell-Proliferation beim Einsatz von HLA-DR3-spezifischen T-Zell-Klonen mit dem Peptid 1113.47 nachweisbar. Dabei lässt sich bei der Zelllinie HT-29 eine deutlich höhere Proliferationsrate messen als bei Caco-2-Zellen.

## 6 Diskussion

Als Voraussetzung für die Manifestation einer Zöliakie wird neben der genetischen Prädisposition die Überwindung der epithelialen Barriere durch Gliadinpeptide und die nachfolgende Interaktion mit dem angeborenen und adaptiven Immunsystem angesehen. Ziel der vorliegenden Arbeit war daher zum einen die Untersuchung des epithelialen Transports von immunogenen und toxischen Gliadinpeptiden, zum anderen sollte der Einfluss dieser Gliadinpeptide auf die Entwicklung von DC analysiert werden.

### 6.1 Intestinale Aufnahme von Gliadinpeptiden

Mit der Nahrung aufgenommene Proteine werden durch proteolytische Enzyme des Gastrointestinaltrakts in Oligopeptide und einzelne Aminosäuren abgebaut. Folglich können diese durch selektive Transporter in Enterozyten aufgenommen werden, wo sie weiter metabolisiert oder transportiert werden [121]. Glutenproteine, die sich aus Gliadinen und Gluteninen zusammensetzen, sind aufgrund ihres hohen Anteils an Glutamin- und Prolin-Residuen größtenteils resistent gegen eine Spaltung durch die vorherrschenden Proteasen wie Pepsin und aus der Magenschleimhaut und vom Pankreas synthetisiertes und in das Darmlumen abgegebene Trypsin. Durch diese proteolytische Resistenz gelangen immunogene und toxische Gliadinpeptide in das Duodenum, was bei Zöliakie-Patienten zu einer inflammatorischen Immunantwort führt [71,122,123]. Um mit dem intestinalen Immunsystem in Kontakt zu treten, müssen Gliadinpeptide die epitheliale Barriere überwinden. Zum einen können kleinere Antigene diese Barriere parazellulär, reguliert durch *Tight Junctions*, überwinden, zum anderen besteht die Möglichkeit, dass Antigene mittels Endozytose in die Enterozyten aufgenommen werden [40–42].

#### 6.1.1 Aufnahme und Transport von Gliadinpeptiden in Enterozyten

In zahlreichen Publikationen wurde über die endozytotische Aufnahme von Gliadinpeptiden in Enterozyten berichtet [124–128]. Als Grundlage für weitere Untersuchungen sollte dieser Sachverhalt auch in der vorliegenden Arbeit geprüft werden. Entsprechend der Arbeit von Barone et al. [124] wurde hierfür die intestinale Zelllinie Caco-2 in einem undifferenzierten Stadium als *In-vitro*-Modell gewählt. Nach

Erreichen der Konfluenz differenzieren Caco-2-Zellen spontan, was phänotypisch der *in vivo* zu beobachtenden Reifung von Krypten zu Villuszellen gleicht [105,129]. Die CLSM-Analyse des vesikulären Transports in konfluenten, differenzierten Caco-2-Zellen erwies sich aufgrund der hohen Zelldichte und der damit verbundenen geringeren Größe der Zellen als technisch nicht praktikabel. Daher wurden für diesen Versuchsansatz undifferenzierte Caco-2-Zellen verwendet, was den Transport von Gliadinpeptiden im Bereich der Krypten simuliert. Der Gebrauch einer intestinalen Zelllinie lieferte in diesem Modell gegenüber Biopsien den Vorteil, dass keine Beeinflussung der Zellen durch umliegendes Gewebe stattfand. Auch wurde dadurch die Verfolgung des Transports in der lebenden Zelle möglich.

Zur Analyse des Transports wurden das immunogene P56-68 und das toxische P31-43 gewählt, welche über eine identische Anzahl an Aminosäuren verfügen. Diese in zahlreichen Studien verwendeten 13-Mere des  $\alpha$ -Gliadins gelten als Vertreter von Gliadinpeptiden, die zu einer T-Zell-Stimulation (P56-68) bzw. zur Auslösung direkter toxischer Effekte (P31-43) in Zöliakie-Patienten fähig sind [29]. Um die Aufnahme und den Transport der Gliadinpeptide mittels CLSM zu detektieren, wurden die zu untersuchenden Peptide mit dem Fluoreszenzfarbstoff Liss oder PF markiert.

Durch die Detektion mittels einer Fluoreszenzmarkierung ist eine Beobachtung des Transports in lebenden Zellen möglich. Allerdings ergibt sich durch die N-terminale Kopplung des Gliadinpeptids mit einem Fluoreszenzfarbstoff eine Limitation der Aussagen, die sich anhand dieser Ergebnisse treffen lassen, da das detektierte Fluoreszenzsignal keine Auskunft über eine mögliche Spaltung der Peptide gibt. Die getroffenen Aussagen müssen daher soweit eingeschränkt werden, dass es sich bei dem detektierten Signal nicht ausschließlich um das intakte Peptid handeln muss, sondern auch Fragmente der Peptide mit Bindung an den Farbstoff oder der isolierte Farbstoff als Signalgeber in Betracht gezogen werden müssen.

Die Ergebnisse der CLSM-Untersuchung zeigten die Aufnahme und den Transport der beiden untersuchten Peptide bzw. deren Spaltprodukte in vesikulären Strukturen. Durch die Beobachtung des Transports im Zeitverlauf konnte hierbei auch eine Auftrennung und Fusion der vesikulären Strukturen beobachtet werden. (Abb. 5-1 und Abb. 5-2). Dies lässt auf einen Transport der Gliadinpeptide oder deren Spaltprodukte im endosomalen System schließen. Die Ergebnisse bestätigen somit die Beobachtungen von Lübbling et al. [123], die ebenfalls den endosomalen

Transport von P31-43 und P56-68 postulierten. Barone et al. [121] zeigten zusätzlich, dass P31-43 an der endosomalen Membran gebunden hatte. Auch beobachteten sie eine verminderte Transportgeschwindigkeit der Vesikel durch den Einfluss von P31-43. Die Detektion der Peptide erfolgte auch in der Arbeit von Barone et al. über eine Markierung mit einem Fluoreszenzfarbstoff. Daher kann auch dabei nicht ausgeschlossen werden, dass statt des intakten Peptids eine Detektion von Peptidfragmenten erfolgte. Übereinstimmend mit der Studie von Barone et al. lässt sich auch in der vorliegenden Arbeit bei einem Vergleich der zurückgelegten Strecke von P31-43 und P56-68 (oder deren Fragmente) ein verzögerter Transport bei Zellen, die mit fluoreszenzmarkiertem P31-43 inkubiert wurden, vermuten.

Da sich aus dem beschriebenen Sachverhalt eine Aufnahme und ein Transport der untersuchten Gliadinpeptide ableiten lässt, ergibt sich daraus die Frage, ob und in wieweit P31-43 und P56-68 durch transzelluläre Transportmechanismen eine epitheliale Barriere überwinden können.

### **6.1.2 Translokation und Abbau von Gliadinpeptiden durch Enterozyten**

Zum jetzigen Zeitpunkt ist nicht vollständig geklärt, wie toxische und immunogene Gliadinpeptide die epitheliale Barriere überwinden können, um nachfolgend bei Zöliakie-Patienten in der *Lamina propria* mit Immunzellen zu interagieren und eine inflammatorische Immunantwort auszulösen. Dass immunogene und toxische Peptide aus Gliadin den gastrointestinalen Verdau durch luminale Proteasen überstehen können, wurde durch Mamone et al. [123] gezeigt. So konnten sie nach dem Verdau von  $\alpha$ -Gliadin das toxische P31-55, das in den ersten 13 Aminosäuren mit P31-43 übereinstimmt, sowie das immunogene P56-68 identifizieren. Des Weiteren zeigten sie, dass P31-55 imstande ist, die epitheliale Barriere intakt zu überwinden. Daher sollte in dieser Arbeit die Hypothese geprüft werden, ob dies auch für das kürzere P31-43 geltend gemacht werden kann. Ein Hinweis auf einen fehlenden Abbau von P31-43 lieferten Lübbling et al. [126]. Sie berichteten, dass dieses Peptid nicht in späte Endosome oder Lysosome transportiert wurde, was einen Abbau während eines transzellulären Transports unwahrscheinlich machte. Dagegen wurde in Biopsien von Zöliakie-Patienten und Kontrollpatienten für das immunogene P57-68, welches im Gegensatz zu P56-68 auf der N-terminalen Seite



um eine Aminosäure kürzer ist, eine komplette Degradation nach dem Transport von der Mukosa zur Serosa gezeigt. Im Gegensatz zu Biopsien von Zöliakie-Patienten konnte bei Biopsien von Kontrollpatienten ein Abbau durch Peptidasen an der Bürstensaummembran nachgewiesen werden. Für die beiden längeren Peptide P56-88 und P31-49 konnte weder bei Zöliakie- noch bei Kontrollpatienten ein Abbau durch Bürstensaum-Peptidasen auf der mukosalen Seite der Biopsie beobachtet werden. Eine Degradation nach dem Transport von der mukosalen zur serosalen Seite wurde nur in Biopsien von Kontrollpatienten, nicht dagegen von Zöliakie-Patienten gezeigt, was auf einen lysosomalen Abbau der Peptide schließen lässt [130,131]. Eine Aussage, ob dieser Abbau auf eine Beteiligung von Enterozyten zurückzuführen ist, lässt sich anhand dieses Modells jedoch nicht eindeutig treffen. Da intestinale Biopsien neben den Epithelzellen verschiedenste Zelltypen auch im Bereich der *Lamina propria* enthalten, ist bei der Untersuchung des Transports und der Degradation von Gliadinpeptiden an Biopsien ein komplexes Zusammenspiel von verschiedenen Zellen zu beachten. Aus dieser Sachlage ergibt sich die Frage, welche Rolle die Enterozyten beim Transport und der Degradation der Peptide spielen. Zur Untersuchung der Beteiligung von Enterozyten wurden in der vorliegenden Arbeit Versuche mit differenzierten Caco-2-Zellen durchgeführt, die als Modell für die epitheliale Barriere dienen. Schumann et al. [132], die ebenfalls dieses Zell-Modell nutzten, beobachteten die epitheliale Transzytose und teilweise Degradation von P56-88. Des Weiteren zeigten Iacomino et al. [133], dass das toxische P31-55 resistent gegen einem Abbau durch Caco-2-Zellen war und einen intakten Caco-2-Monolayer passieren konnte.

Die mittels Fluoreszenzspektroskopie, Durchflusszytometrie und CLSM erzielten Ergebnisse deuten auf eine intrazelluläre Aufnahme und einen transzellulären Transport von fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden hin (Abb. 5-3 bis Abb. 5-6). Ergänzend zeigte die Analyse durch MALDI-TOF-MS den zeitabhängigen Abbau von P31-43 und P56-68 auf der apikalen Membranseite (Abb. 5-7). Aus diesem Grund korrelieren Ergebnisse, die sich auf die Fluoreszenzintensität beziehen nicht notwendigerweise mit dem tatsächlichen Transport von intakten Peptiden über die intestinale Zellbarriere. Die gemessene Intensität repräsentierte somit auch fluoreszenzmarkierte Peptidfragmente oder den abgespaltenen Farbstoff.

Wie bereits im vorherigen Abschnitt beschrieben, konnte in Caco-2-Zellen, die sich in einem undifferenzierten Stadium befanden, die Aufnahme und der Transport von

Gliadinpeptiden gezeigt werden. Beruhend auf den Daten der Fluoreszenzintensität bei der durchflusszytometrischen und CLSM-Untersuchung, konnten in der vorliegenden Arbeit die Aufnahme und der Transport der fluoreszenzmarkierten Peptide auch in differenzierten Caco-2-Zellen abgeleitet werden. Aufgrund der nachgewiesenen Spaltung der Peptide auf der apikalen Membranseite ist allerdings davon auszugehen, dass der identifizierte Fluoreszenzfarbstoff neben der Bindung an intaktem Peptid auch Fragmente repräsentierte.

Die Ergebnisse aus Abb. 5-3 und Abb. 5-5 zeigen, dass die Inkubation mit P56-68 im Gegensatz zu P31-43 über eine längere Zeitspanne oder mit einer höheren Konzentration zu einer Sättigung der Aufnahme oder der Translokation führten. Ein Vergleich beider Peptide zeigte bei Inkubation mit P56-68 über die Zeit eine geringere Translokationsrate als bei Inkubation mit P31-43. Dies könnte ein Hinweis auf unterschiedliche Transportprozesse der untersuchten Gliadinpeptide sein.

Zur Untersuchung des Transportmechanismus der verwendeten Gliadinpeptide wurde M $\beta$ CD als Endozytoseinhibitor eingesetzt. M $\beta$ CD besitzt cholesterolextrahierende Eigenschaften und hemmt dadurch die Clathrin-abhängige Endozytose, wobei auch eine Clathrin-unabhängige Hemmung der Endozytose durch M $\beta$ CD diskutiert wird [134–137]. Wie in Abb. 5-3 und Abb. 5-5 dargestellt, wurde bei Zellen, die mit M $\beta$ CD inkubiert wurden, die Aufnahme und die Translokation von P31-43 oder dessen Fragmenten gehemmt, was Rodal et al. [134] und Leterrier et al. [137] auf eine Clathrin-unabhängige endozytotische Aufnahme schließen ließ. Im Gegensatz dazu wurde weder die Aufnahme noch die Translokation von P56-68 durch M $\beta$ CD beeinflusst, was für dieses Peptid auf einen anderen, Cholesterol-unabhängigen Transportmechanismus hindeutet.

Diese Ergebnisse sind auch in Übereinstimmung mit den Erkenntnissen von Caputo et al. [138], die eine verringerte Endozytose des Fluoreszenzsignals in Caco-2-Zellen beobachteten, die unter dem Einfluss von M $\beta$ CD mit fluoreszenzmarkiertem P31-43 inkubiert worden waren; mit fluoreszenzmarkiertem P57-68 war die Endozytose nur schwach gehemmt. Auch Schumann et al. [132] beobachteten die Wirkung von M $\beta$ CD auf den Transport von fluoreszenzmarkierten Gliadinpeptiden. Sie zeigten, dass die Translokation des intakten 33mer P56-88 durch den Einsatz von M $\beta$ CD gehemmt wurde.

Neben den Unterschieden in der intrazellulären Aufnahme von Gliadinpeptiden wurde auch über Unterschiede bezüglich endozytotischer Transportmechanismen für

P31-43 und P56-68 berichtet. Frühere Studien, die fluoreszenzmarkierte Peptide oder eine Immunfärbung zur Identifizierung der Peptide einsetzten, wiesen darauf hin, dass P56-68 in späte Endosome transportiert wird, während P31-43 in frühen Endosomen verbleibt [126,127,139]. Aufgrund etwaiger struktureller Veränderungen der Peptide, die nicht durch eine Verfolgung des Fluoreszenzsignals angezeigt werden, sind die dazu getroffenen Aussagen begrenzt. Aus diesem Grund wurden die in der vorliegenden Arbeit fluorometrisch gewonnenen Daten durch MALDI-TOF-MS Analysen ergänzt. Diese zeigten eine zeitabhängige Spaltung beider eingesetzter Gliadinpeptide auf der apikalen Seite der Zellen. Wie bereits von Hausch et al. [71] an der Dünndarmmukosa von Ratten beobachtet wurde, können immunogene Gliadinpeptide teilweise durch Peptidasen der Bürstensaummembran gespalten werden. Dabei wurde das intakte P57-68 mit einer Halbwertszeit von 35 min abgebaut. Zwischenprodukte des Abbaus mit einer hohen Stabilität der Sequenz PFPQPQLP wurden über längere Inkubationszeiten identifiziert. Die Autoren berichteten, dass die Ergebnisse von Experimenten mit humaner Bürstensaummembran analog zu den Ergebnissen an der Dünndarmmukosa von Ratten betrachtet werden könnten, aber keine signifikanten Mengen an Degradationsprodukten des intakten Peptids detektiert werden konnten. Für die in der Bürstensaummembran lokalisierten und für diesen Prozess in Frage kommenden Enzyme wurden APN, CPP und DPP IV ausgemacht [71]. Entsprechend der in Abb. 5-7 dargestellten Ergebnisse bleibt die Mehrheit an P56-68 und P31-43 über eine 3-stündige Inkubation hinweg intakt. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde bei einem Großteil beider Peptide das C-terminale Tyrosin abgespalten, wahrscheinlich bedingt durch die Aktivität der CPP.

Durch Analyse des basalen Zellmediums nach 3-stündiger Inkubation des Caco-2-Monolayers wurde weder das intakte P56-68 noch Fragmente des Peptids, die vom Abbau durch APN, CPP oder DPP IV herrühren könnten, identifiziert. Bezogen auf die fluoreszenzspektroskopischen Ergebnisse wäre ein geringer Transport an Peptid abzuleiten gewesen. Daher kann angenommen werden, dass das Fluoreszenzsignal durch kleinere Fragmente oder dem abgespaltenen Farbstoff bedingt war. Nach Matysiak-Budnik et al. [130] könnte auch in diesem Fall P56-68 innerhalb des endosomalen Transports vollkommen abgebaut worden sein. Im Gegensatz dazu konnte bei einer Inkubation über 24 h ein geringer Anteil des intakten P56-68, aber hauptsächlich das C-terminal verkürzte P56-67 im basalen Kompartiment identifiziert

werden. Arentz-Hansen et al. [136] berichteten, dass das C-terminal lokalisierte Tyrosin von P57-68 ein kritischer Bestandteil für die Bindung an HLA-DQ2 ist. In ihren Versuchen verhinderte eine Abspaltung dieser Aminosäure die Bindung an HLA-DQ2-Moleküle und führte folglich nicht zu einer Identifizierung durch T-Zellen. Eine schrittweise Verkürzung des Peptids an der N-terminalen Seite führte ebenfalls zu einem sukzessiven Verlust der Bindungsaffinität an HLA-DQ2 und der Erkennung durch T-Zellen. Aus diesem Grund könnte angenommen werden, dass auch P56-67 nicht zur T-Zell-Aktivierung fähig ist und daraus folgend auf diesem Weg keine inflammatorische Antwort des adaptiven Immunsystems bei Zöliakie-Patienten provoziert werden kann.

Die MALDI-TOF-MS-Analyse des basalen Mediums von Caco-2-Zellen, die 3 h mit fluoreszenzmarkierten P31-43 inkubiert wurden, zeigte sowohl intaktes P31-43 als auch C-terminal verkürztes P31-42. Nach 24-stündiger Inkubation konnte P31-43 nur in geringen Anteilen detektiert werden; ein Großteil wurde zu P31-42 abgebaut. P31-43 wird mit der Induktion der IL-15 Produktion bei Zöliakie-Patienten in Verbindung gebracht, was zur Aktivierung von IEL und zur Zerstörung von Enterozyten führt [75]. Der zugrundeliegende Mechanismus der IL-15-Produktion durch P31-43 ist derzeit noch nicht geklärt. Die Frage, ob P31-42 auch zur Vermittlung toxischer Effekte befähigt ist, bleibt daher offen.

Neben dem transzellulären Transport müssen auch parazelluläre Transportwege über die epitheliale Barriere als Mechanismus für eine Translokation von Gliadinpeptiden in Betracht gezogen werden. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass Gliadin die parazelluläre Permeabilität erhöht [140–142]. Clemente et al. [143] postulierten, dass das toxische P31-55 im Gegensatz zu einem nicht-toxischen Gliadinpeptid (P22-39) den parazellulären Flux in der intestinalen Mukosa von Kaninchen steigern kann. Versuche mit Biopsien von Zöliakie-Patienten konnten hingegen keinen wesentlichen parazellulären Flux des toxischen P31-49 und des immunogenen P56-68 zeigen [131]. Dennoch führt die durch Gliadinpeptide ausgelöste Inflammation zu einer epithelialen Schädigung und folglich zu einem Verlust von epithelialen Enzymen, was eine verringerte Degradation von Gliadinpeptiden verursachen könnte [144–147].

## 6.2 Reifung dendritischer Zellen

Gliadinpeptide, welche die epitheliale Barriere überwunden haben, treffen im Bereich der *Lamina propria* auf Immunzellen, wie Lymphozyten, Makrophagen und DC. Bei Zöliakie-Patienten werden immunogene Gliadinpeptide durch HLA-DQ2 / -DQ8-positive APZ T-Zellen präsentiert, was zu einer inflammatorischen Immunantwort führt. Toxische Gliadinpeptide scheinen ihre inflammatorische Wirkung auf einem Weg des angeborenen Immunsystems zu vermitteln, dessen zugrundeliegender Mechanismus aber noch nicht geklärt ist [148].

Es wird vermutet, dass DC eine maßgebliche Rolle bei der Entwicklung einer Immunantwort spielen. Die Art der Immunantwort hängt dabei von der Reifung und den funktionalen Eigenschaften der DC ab. Durch unzureichende Expression von kostimulatorischen Molekülen oder der Produktion immunsuppressiver Zytokine halten DC ein Stadium der oralen Toleranz aufrecht, in dem es zu keiner Aktivierung von inflammatorischen T-Zellen kommt. Nach derzeitigem Kenntnisstand verbleiben intestinale DC zur Aufrechterhaltung der Toleranz in einem relativ unreifen Stadium und führen dadurch nicht zur Aktivierung von T-Zellen. Ein Weg diese Toleranz zu durchbrechen sind daher Signale, die die Reifung dendritischer Zellen fördern [149,150].

### 6.2.1 Beeinflussung der Reifung dendritischer Zellen durch Gliadin

Der aktuelle Wissensstand über die Rolle von intestinalen DC in der Pathogenese von Zöliakie ist lückenhaft. Dies ist auch darauf zurückzuführen, dass die Isolation und Anreicherung von DC aus dem Intestinum bereits zu einer unwillkürlichen Aktivierung dieser Zellen führt [151,83]. Um diese unkontrollierte Stimulation der Zellen zu vermeiden, wurden in der vorliegenden Arbeit DC aus CD14<sup>+</sup> Monozyten des peripheren Blutes generiert. Die isolierten Monozyten wurden hierfür mit IL-4 und GM-CSF inkubiert, wodurch sich iDC entwickelten. Diese Strategie erscheint gerechtfertigt, da in früheren Studien die Akkumulation von Monozyten aus peripherem Blut in der intestinalen Mukosa gezeigt werden konnte, bei denen es sich wahrscheinlich um Vorstufen von DC handelte [152,153,83].

Die Reifung von Monozyten und DC wurde in bisherigen Studien vornehmlich durch Inkubation mit Pepsin- bzw. Pepsin / Trypsin-verdaulichem Gliadin untersucht. Durch Cinova et al. [76] konnte gezeigt werden, dass aus Blut isolierte Monozyten durch

Stimulation mit Pepsin-verdaulichem Gliadin eine erhöhte Konzentration an IL-8 und TNF- $\alpha$  sezernierten. Dabei erfolgte bei Patienten mit aktiver Zöliakie die höchste Sekretion, gefolgt von Zöliakie-Patienten in Remission und gesunden Personen. Zusätzlich wurde durch Schaffung proinflammatorischer Bedingungen mittels IFN- $\gamma$  eine weitere Stimulation der TNF- $\alpha$ -Sekretion bewirkt. In diesem Zusammenhang zeigten Cinova et al. auch, dass Monozyten von HLA-DQ2-positiven Individuen im Vergleich zu Monozyten von HLA-DQ2-negativen Personen *per se* sowie bei Stimulation mit IFN- $\gamma$  oder Gliadin eine höhere Konzentration an IL-8 sezernieren [81]. Jelincova et al. [77] beobachteten außerdem bei der Inkubation mit den Monozytenzelllinien THP-1 und U-937 eine gesteigerte Sekretion von TNF- $\alpha$ - und IL-8, die durch zusätzliche Stimulation mit IFN- $\gamma$  nochmals erhöht wurde [82]. Des Weiteren konnte durch Gliadin die Expression von Reifungsmarkern auf Monozyten beeinflusst werden. Dabei steigerte verdautes Gliadin die Oberflächenexpression der Reifungsmarker CD83, CD86 und CD40. Der Einsatz von IFN- $\gamma$  führte dabei zu einer weiter gesteigerten Oberflächenexpression von Reifungsmarkern, wodurch neben CD83, CD86 und CD40 auch eine gesteigerte Expression von CD80 gezeigt werden konnte. Bei der Aktivierung von Monozyten scheinen IFN- $\gamma$  und Gliadin daher synergistisch zu wirken [82,81].

Auch für DC konnte in verschiedenen Studien ein Einfluss von verdaulichem Gliadin auf die Zytokinexpression und deren Reifung gezeigt werden. In Experimenten, bei denen DC, die aus peripherem Blut isolierten Monozyten generiert wurden, mit Pepsin / Trypsin-verdaulichem Gliadin inkubiert wurden, konnte sowohl bei Zöliakie-Patienten als auch bei Gesunden ein Anstieg der Sekretion von IL-6, IL-8 und IL-12 beobachtet werden. Aufgrund einer erhöhten Sekretion von IL-4 und IL-10 bei HLA-DQ2-positiven gesunden Individuen wird eine antiinflammatorische Gegenregulation diskutiert [83]. Eine weitere Studie, bei der DC (generiert aus Monozyten von peripherem Blut gesunder Personen) mit Pepsin-verdaulichem Gliadin inkubiert wurden, bestätigte den Anstieg von IL-6 und IL-8, jedoch nicht den von IL-12. Zusätzlich wurde hier eine Zunahme von TNF- $\alpha$  und eine Verringerung der TGF- $\beta$ -Sekretion festgestellt [79]. Unabhängig vom Genotyp des Donors konnte auch eine Reifung der DC aufgrund eines Anstiegs der Expression von CD83, CD86, CD25 und HLA-DR beobachtet werden. Auf DC von Zöliakie-Patienten unter einer glutenfreien Diät war die Expression von HLA-DR, CD83 und CD86 reduziert [83]. Der in dieser Studie nicht getestete Reifungsmarker CD80 war in einer weiteren

Untersuchung auf DC von gesunden Individuen vermehrt exprimiert [79]. Die Reifung der DC konnte auch in einem Versuch mit murinen DC, die aus Zellen des Knochenmarks generiert wurden, bestätigt werden. Die Inkubation mit Chymotrypsin-verdaulichem Gluten induzierte hierbei eine erhöhte Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen, CD40, CD54 und CD86 [84]. Untersuchungen, die sich mit dem Mechanismus der Reifungsinduktion von DC durch Gliadin beschäftigten, legten eine Beteiligung von NF- $\kappa$ B und p38 MAPK nahe [83,79]. Zusammenfassend zeigten die genannten Studien, dass Gliadin bei DC von Zöliakie-Patienten und von Gesunden einen proinflammatorischen Einfluss auf deren Entwicklung hatte. Welche Gliadinpeptide für den inflammatorischen Effekt verantwortlich sind, konnte bisher allerdings nicht geklärt werden.

### **6.2.2 Beeinflussung der Reifung dendritischer Zellen durch immunogene und toxische Gliadinpeptide**

Der Einfluss spezifischer Gliadinpeptide auf die Reifung dendritischer Zellen wurde bisher nur an Dünndarmbiopsien untersucht. So lieferten Maiuri et al. [75] einen Hinweis darauf, dass toxische Gliadinpeptide zu einer Reifung von Monozyten und / oder DC führen. Sie beobachteten, dass das toxische P31-43 neben erhöhter IL-15-Produktion und Aktivierung der p38 MAPK auch die verstärkte Expression des Reifungsmarkers CD83 auf APZ induziert. Auch zeigten sie, dass durch den Einfluss der toxischen Gliadinpeptide die Aktivierung von T-Zellen durch immundominante Gliadinpeptide bewirkt werden kann. Aufgrund der zellulär komplexen Zusammensetzung und den entsprechenden Zell-Zell-Wechselwirkungen innerhalb einer Biopsie sind Rückschlüsse auf die Beteiligung einzelner Zelltypen jedoch schwierig.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, den jeweiligen Einfluss immunogener und toxischer Gliadinpeptide auf die Entwicklung von DC zu untersuchen. Dabei wurden das toxische P31-43 und das immunogene P56-68 sowie das basale Medium von intestinalen Epithelzellen (Caco-2), die mit fluoreszenzmarkiertem P31-43 und P56-68 inkubiert wurden, untersucht. Die Inkubation erfolgte zum einen in iDC-Inkubationsmedium (RPMI-1640 + 2 % HS) über 24 h, zum anderen wurden die iDC im basalen Zellkulturmedium von Caco-2-Monolayern inkubiert, das als Basismedium HBSS enthielt. Um einen Vergleich dieser Versuche mit der Inkubation

von intakten P31-43 und P56-68 ziehen zu können, wurden diese Peptide mit iDC auch in HBSS inkubiert.

Zur Beurteilung der Reifung von DC wurden verschiedene Oberflächenmarker analysiert. Es zeigte sich, dass das als positive Kontrolle für die Reifung herangezogene LPS während einer Inkubation in iDC-Inkubationsmedium zu einer signifikanten Steigerung der Reifungsmarker CD80, CD86 und CD83 führte und somit dessen Einsatz als Positivkontrolle erlaubte. Bei der Inkubation mit LPS in HBSS konnte allerdings kein signifikanter Effekt beobachtet werden (Abb. 5-10 und Abb. 5-11). Dies legt eine hemmende Wirkung des HBSS-Mediums bzw. einen steigernden Einfluss des iDC-Inkubationsmediums auf die Reifung von DC nahe. Zur Beurteilung der Zytokinsekretion wurde als Kontrolle das Medium von LPS-inkubierten DC analysiert. Hier war in allen getesteten Versuchsansätzen ein starker Anstieg von IL-8, TNF- $\alpha$  und TGF- $\beta$  zu beobachten.

Im Gegensatz zur Positivkontrolle induzierten P31-43 und P56-68 in keiner der getesteten Ansätze eine Veränderung der Oberflächenexpression von CD80, CD86 oder CD83, was darauf hinweist, dass die getesteten Peptide keinen Einfluss auf die Reifung der DC hatten. Im Gegensatz zu P56-68 führte die Inkubation mit P31-43 in iDC-Inkubationsmedium zu einer signifikant gesteigerten Sekretion der Zytokine IL-8 und TNF- $\alpha$ , was auf eine proinflammatorische Reaktion der DC gegenüber dem toxischen Peptid hinweist. In HBSS-Medium konnte kein signifikanter Effekt für P31-43 beobachtet werden, jedoch lässt sich bei Bezug auf den Mittelwert auch ein Anstieg der IL-8 und TNF- $\alpha$  Sekretion vermuten, was die Ergebnisse der Inkubation in iDC-Inkubationsmedium, aber auch die zuvor getroffene Aussage über einen verminderten Effekt bei Inkubation mit HBSS, bestätigt.

Einen unterschiedlichen Einfluss von toxischen und immunogenen Gliadinpeptiden auf die Zytokinsekretion konnten Jelinkova et al. [82] bereits auf der Ebene von Monozyten zeigen. In einer Monozytenzelllinie führte P31-43 in ihren Versuchen zu einer gesteigerten Sekretion von TNF- $\alpha$  und IL-8, wohingegen es beim Einsatz des immunogenen P56-88 zu einem geringeren Anstieg kam. Ob diese Peptide auch einen Einfluss auf die Oberflächenexpression von Reifungsmarkern hatten, war in der Arbeit von Jelinkova et al. [82] nicht Gegenstand der Untersuchung.

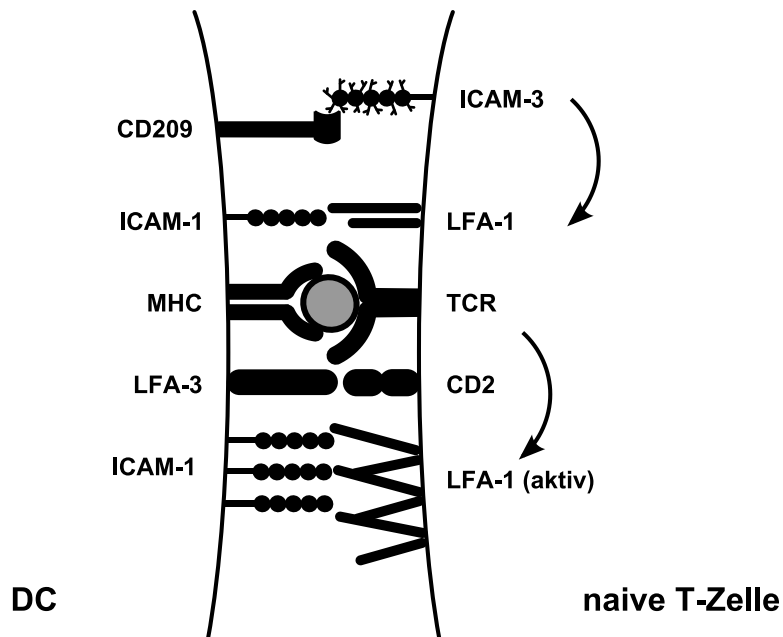
Ausgehend von den dargestellten Ergebnissen und der Annahme, dass die Oberflächenexpression von CD80, CD86 und CD83 eine Aussage über die Reifung von DC zulässt, waren keine Anzeichen für eine fortschreitende Reifung von DC



durch P31-43 oder P56-68 abzuleiten. Da in anderen Studien beobachtet wurde, dass verdautes Gliadin zu einer verstärkten Oberflächenexpression von Reifungsmarkern führte, könnten andere oder veränderte Gliadinpeptide oder aber synergetische Wirkungen von Gliadinbestandteilen für diesen Effekt verantwortlich sein. Außerdem konnte gezeigt werden, dass P31-43 bei DC die Freisetzung des proinflammatorischen Zytokins TNF- $\alpha$  sowie des Chemokins IL-8 fördert.

Die *in vitro* Ergebnisse weisen darauf hin, dass das toxische P31-43 die Auslösung einer angeborenen Immunreaktion *in vivo* über DC vermitteln könnte. Die Produktion proinflammatorischer Zytokine bei der Inkubation von Biopsien von Zöliakie-Patienten mit verdaulichem Gliadin könnte daher unter anderem auf die toxische Sequenz 31-43 von  $\alpha$ -Gliadin zurückzuführen sein.

Als ein Faktor, der beim initialen Kontakt von T-Zellen mit DC beteiligt ist, wird der C-Typ-Lektinrezeptor CD209 diskutiert, der auch als DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*) bezeichnet wird. Es besteht die Vermutung, dass durch CD209 eine initiale Immunantwort unterstützt werden kann. Gijzen et al. [154] erbrachten Hinweise dafür, dass CD209 eine antigenunabhängige und transiente Bindung zwischen DC und naiven T-Zellen vermittelt und dadurch die Bindung zwischen dem T-Zellrezeptor und dem HLA-Molekül ermöglicht. *Intercellular adhesion molecule* (ICAM) -3 dient CD209 dabei als Bindungspartner auf T-Zellen (Abb. 6-1). Nach Identifizierung spezifischer Peptide durch T-Zellen würde die initiale Bindung unter Beteiligung von CD80 und / oder CD86 gefestigt, wodurch eine sogenannte immunologische Synapse entsteht und eine verstärkte T-Zell-Proliferation initiiert werden könnte. Einen Einfluss auf die T-Zell-Proliferation scheint CD209 allerdings nur zu haben, wenn die aus der Interaktion resultierende Proliferationsrate von T-Zellen schwach ausgeprägt ist [154–156]. Daher würde CD209 nur eine initiale Immunantwort unterstützen, die dann durch weitere Stimuli ausgeweitet werden könnte. Martinez et al. [157] fanden heraus, dass CD209 CD3-aktivierte T-Zellen stimulieren kann IL-2 zu produzieren und ein starkes TCR-Signal zu empfangen, um nachfolgend die Interaktion von TCR mit APZ zu verstärken und die Immunantwort zu steigern.



**Abb. 6-1:** Funktion von CD209 bei der Interaktion von DC mit naiven T-Zellen. Adaptiert nach [158].

In der vorliegenden Arbeit konnte bei der Inkubation von iDC mit P31-43 und P56-68 eine Steigerung der Oberflächenexpression von CD209 gezeigt werden. Die Folge könnte daher eine erhöhte initiale Interaktion mit T-Zellen sein, was eine Interaktion von T-Zellen mit immunogenen Gliadinpeptiden begünstigen und dadurch die Schwelle für eine adaptive Immunantwort senken würde.

Im Gegensatz zu den getesteten Gliadinpeptiden verminderte das als Kontrollantigen eingesetzte LPS die Oberflächenexpression von CD209 auf DC, was auch in anderen Studien gezeigt werden konnte [159,160]. LPS hemmt den JAK-STAT (*Janus kinase / signal transducer and activator of transcription*) Signalweg, der für eine gesteigerte Expression von CD209 benötigt wird [156].

### 6.2.3 Beeinflussung der Reifung dendritischer Zellen durch Caco-2-Zellkulturmedium

Im Gegensatz zur Inkubation von DC mit intaktem P31-43 und P56-68 wurde auch das basale Zellkulturmedium von Caco-2-Zellen eingesetzt, die apikal mit fluoreszenzmarkiertem P31-43 oder P56-68 inkubiert wurden. Hierbei sollte getestet werden, ob der Einfluss der Peptide auf Enterozyten bzw. das Überwinden der epithelialen Barriere durch diese Peptide oder deren Fragmente eine Auswirkung auf die Reifung von DC hat. Bei diesem Ansatz spielten somit neben den translozierten

Gliadinpeptiden und deren Fragmenten auch die Reaktion von Caco-2-Zellen auf die Gliadinpeptide eine Rolle. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Pepsin / Trypsin-verdautes Gliadin sowie P31-43 eine proinflammatorische Wirkung bei Caco-2-Zellen auslösten. So wurde unter anderem beobachtet, dass durch den Einfluss von Pepsin / Trypsin-verdaulichem Gliadin die Sekretion von IL-6 und IL-8 induziert werden kann [161,162]. Barone et al. [139] berichteten, dass P31-43 im Gegensatz zu P57-68 zu einer gesteigerten Expression von IL-15-mRNA führte. Neben der vermehrten IL-15-Transkription konnte auch der oberflächengebundene Anteil an IL-15 auf Caco-2-Zellen durch intrazelluläre Transportprozesse erhöht werden.

Entsprechend Abb. 5-12 konnte gezeigt werden, dass die Inkubation von iDC mit dem basalen Zellkulturmedium von Caco-2-Zellen, die 24 h mit P31-43 inkubiert worden waren, zu einer signifikant erhöhten Oberflächenexpression des Reifungsmarkers CD80 führte. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation mit P31-43 ohne vorherigen Enterozyteneinfluss zu keiner gesteigerten CD80-Expression.

Das kostimulatorische Molekül CD80 ist zusammen mit CD86 an der Interaktion mit T-Zellen beteiligt. Dabei ist der Anstieg der Oberflächenexpression von CD80 meist mit der von CD86 verbunden. CD80 und CD86 können beide an die auf T-Zellen lokalisierten Moleküle CD28 und CD152 binden. Daher wird eine ähnliche Funktion von CD80 und CD86 angenommen, wobei CD86 die Bindung zwischen DC und T-Zellen in einem höheren Ausmaß zu verstärken scheint als CD80. CD28 ist als Kostimulator der T-Zell-Funktionen bekannt, während CD152 eine hemmende Funktion auf T-Zellen ausübt. Einige Autoren vermuten, dass CD80 der Hauptligand von CD152 ist und daher im Gegensatz zu CD86 eher inhibitorische Signale vermittelt. Somit wäre CD80 an der Aufrechterhaltung einer Immuntoleranz beteiligt, während diese inhibitorische Funktion durch einen Anstieg der CD86-Expression außer Kraft gesetzt werden könnte [163,164]. Basierend darauf könnte der Einfluss der Degradation und Translokation von P31-43 durch Caco-2-Zellen daher einen Beitrag zur Aufrechterhaltung der Immuntoleranz leisten.

Neben CD80 konnte bei der Inkubation von iDC mit dem basalen Zellkulturmedium von Caco-2-Zellen, die 24 h mit P31-43 inkubiert wurden, wie schon bei der Inkubation mit P31-43 und P56-68 ohne Enterozyteneinfluss, eine Steigerung der CD209 Oberflächenexpression beobachtet werden. Entsprechend der diskutierten Funktionen von CD209 ergibt sich auch in diesem Fall die Hypothese, dass die

erhöhte Expression auf DC die Schwelle für eine adaptive Immunantwort senken könnte.

Entsprechend dem derzeitigen Kenntnisstand über den Beitrag von CD80 und CD209 für die Aufrechterhaltung der Immuntoleranz oder die Initiierung einer Immunreaktion ist eine klare Aussage schwierig. Aufgrund des fehlenden Anstiegs weiterer Reifungsmarker erscheint eine inflammatorische Antwort jedoch unwahrscheinlich. Allerdings könnte auch das als Inkubationsmedium genutzte HBSS einen möglichen Effekt vermindert haben, der beim Einsatz von iDC-Inkubationsmedium aufgetreten wäre, da das in iDC-Inkubationsmedium enthaltene HS zu einer Steigerung der Reifung und Zytokinsekretion führen könnte.

Die Inkubation mit den übrigen basalen Zellkulturmedien führte dagegen zu keiner signifikanten Veränderung der Reifungsmarker oder CD209. Die Behandlung von Caco-2-Zellen mit dem toxischen P31-43 scheint daher nur bei einer längeren Inkubationszeit einen Einfluss auf DC zu haben. Zum einen könnte die längere Inkubationszeit zu einer vermehrten Translokation von P31-43 über das Caco-2-Monolayer geführt haben, wodurch ein direkter Einfluss von P31-43 auf die DC bestanden hätte. Entsprechend der MALDI-TOF-MS-Messungen scheint allerdings nur ein geringer Teil an intaktem P31-43 die epitheliale Barriere überwinden zu können. Da jedoch noch nicht geklärt ist, ob auch kürzere Sequenzen dieses Peptids zu einem inflammatorischen Effekt führen, könnten auch entstandene Fragmente von P31-43 zu einer Reaktion der DC geführt haben. Zum anderen könnte dieser Effekt indirekt, durch die vermehrte Zytokin-Produktion durch Caco-2-Zellen, nach einer längeren Inkubationszeit mit P31-43 ausgelöst werden. Barone et al. [139] beobachteten bei einer Inkubation mit P31-43, dass erst nach 16 h eine erhöhte Transkription von IL-15 messbar wurde. Auch eine signifikant vermehrte Oberflächenexpression von IL-15 konnte erst nach 6 h Inkubation gemessen werden. Dies könnte erklären, warum in der vorliegenden Arbeit nach 3 h Inkubationszeit noch kein Effekt auf die Entwicklung der DC zu beobachten war. Gegen den direkten Einfluss von IL-15 auf die Entwicklung der DC spricht allerdings, dass IL-15 auf der Oberfläche von Enterozyten via IL-15-Rezeptor gebunden bleibt und nicht ins umliegende Medium sezerniert wird. Die Funktion von IL-15 beschränkt sich dabei vermutlich auf direkte Zellinteraktionen wie Interaktionen mit IEL [165,166]. Daher ist anzunehmen, dass andere von Enterozyten produzierte Zytokine oder Effekte für die Reaktion von DC verantwortlich sind.

Im Gegensatz zu P31-43 zeigten in der vorliegenden Arbeit weder eine drei- noch eine 24-stündige Inkubation von Caco-2-Zellen mit dem immunogenen P56-68 einen Einfluss auf die Entwicklung von DC. Bisher konnte keine inflammatorische Wirkung von immunogenen Gliadinpeptiden auf Enterozyten beobachtet werden, die zu einer Reifung von DC führen könnten [139]. Auch die geringe Menge an translozierten P56-68 scheint keinen Einfluss auf die Entwicklung von DC zu haben. Ob Fragmente dieses Peptids an einer Reifung von DC beteiligt sein könnten, ist noch nicht geklärt. Allerdings ist eine Bindung an HLA-DQ2-Moleküle und eine daraus folgende Interaktion mit T-Zellen nicht mit einer Spaltung des C-terminal lokalisierten Tyrosins vereinbar. Auch eine sukzessive Abspaltung auf der N-terminalen Seite des immunogenen Peptids führt zu einer verminderten Bindungsaffinität an HLA-DQ2 [167].

### **6.3 Interaktion von Enterozyten mit T-Zellen**

Neben der Präsentation von immunogenen Gliadinpeptiden durch APZ wird auch deren Präsentation durch Enterozyten diskutiert. Als Voraussetzung für eine Interaktion mit T-Zellen sind Enterozyten zur Expression von HLA-Molekülen befähigt. Wie in Abb. 5-16 und Abb. 5-17 dargestellt, konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die beiden untersuchten Enterozyten-Zelllinien auf ihrer Oberfläche negativ für HLA-DQ-Moleküle sind, die Oberflächenexpression von HLA-DR und HLA-Klasse-I-Molekülen aber durch inflammatorische Stimuli induziert bzw. gesteigert werden kann. Fais et al. [168] führten dazu Versuche mit Dünndarmbiopsien von Zöliakie-Patienten durch, die zeigten, dass die Inkubation der Biopsien mit Pepsin / Trypsin-verdaulichem Gliadin zu einer gesteigerten Expression von HLA-DR in intestinalen Epithelzellen im Bereich der Krypten führte; bei Biopsien von Kontrollpatienten war die Expression nicht induzierbar. In der vorliegenden Arbeit beeinflusste eine Inkubation mit dem toxischen P31-43 oder dem immunogenen P56-68 die Oberflächenexpression von HLA-DR- oder HLA-Klasse-I-Molekülen auf Epithelzellen (HT-29- oder Caco-2) nicht, was jedoch nicht ausschließt, dass Gliadinpeptide über diese HLA-Moleküle präsentiert werden können. In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass Gliadinpeptide nicht ausschließlich über HLA-DQ2- bzw. -DQ8-Moleküle, sondern auch über HLA-DR- und -DP-Moleküle präsentiert werden können [169,170].

Zimmer et al. [127,171] konnten zeigen, dass Gliadinpeptide nach endozytotischer Aufnahme in HLA-DR-positiven späten Endosomen intestinaler Epithelzellen lokalisiert sind. Dies deutet darauf hin, dass Gliadinpeptide auf der Oberfläche von Enterozyten durch HLA-DR präsentiert werden könnten. Für die Präsentation über HLA-DR wird auch eine tolerogene Wirkung in Betracht gezogen, da Enterozyten nicht die kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 exprimieren [172,173]. Unter der Annahme, dass die Antigenpräsentation durch Enterozyten zu einer tolerogenen T-Zell-Reaktion führt, könnte eine gesteigerte Oberflächenexpression von HLA-DR bei inflammatorischen Einflüssen eine Gegenregulation zur bestehenden Entzündung darstellen.

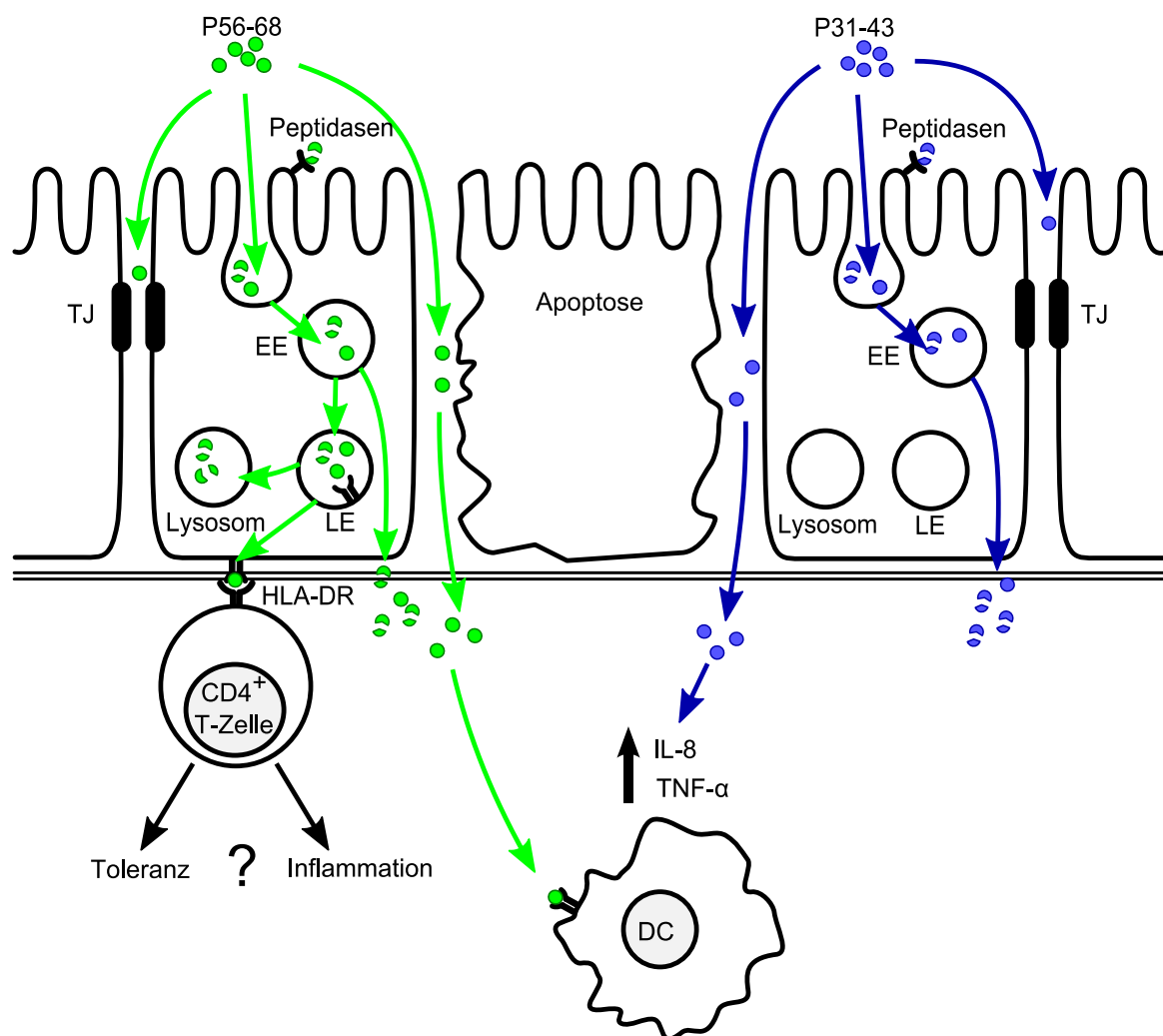
Auch der Einfluss von Gliadinpeptiden auf die Interaktion von Enterozyten und T-Zellen wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Weder durch HT-29- noch durch Caco-2-Zellen, die mit dem immunogenen Gliadinpeptid LQFPQPELPYPQ (deamidiertes P58-70) inkubiert wurden, konnte eine Proliferation von HLA-DQ2-spezifischen T-Zellen induziert werden. Diese Beobachtung war in Übereinstimmung mit den Ergebnissen der durchflusszytometrischen Analyse, bei der keine Oberflächenexpression von HLA-DQ-Molekülen auf HT-29- oder Caco-2-Zellen detektierbar war. In einem weiteren Schritt sollte die T-Zell-stimulatorische Aktivität von Enterozyten via HLA-DR überprüft werden. Die für die Experimente benötigten T-Zell-Klone wurden im Institut für Immunhämatologie und Bluttransfusion (Prof. Dr. Frits Koning, Leiden, NL) gewonnen und für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt. Da keine gliadinspezifischen HLA-DR-interagierenden T-Zell-Klone zur Verfügung standen, wurde die Interaktion mit HLA-DR mittels eines alternativen Peptids untersucht, für das ein T-Zell-Klon verfügbar war. Als Antigen wurde das Peptid mit der Sequenz KTIAYDEEARRGL eingesetzt. Diese Sequenz entspricht dem Peptid HSP 3-14 (Peptidsequenz eines Hitzeschockproteins in *Mycobacterium tuberculosis*) und kann über HLA-DR3 präsentiert werden. Der eingesetzte T-Zell-Klon kann folglich mit diesem Komplex interagieren [174]. Die Inkubation der beiden Zelllinien mit HSP 3-14 führte zu einer gesteigerten Proliferation der eingesetzten T-Zell-Klone, die beim Einsatz von HT-29- gegenüber Caco-2-Zellen ausgeprägter war. Bereits bei der durchflusszytometrischen Untersuchung zeigte sich eine erhöhte Oberflächenexpression von HLA-DR auf HT-29-Zellen, was eine vermehrte Interaktion mit T-Zellen erklären könnte. Aus der gesteigerten T-Zellproliferation durch die Interaktion mit den beiden intestinalen Zelllinien lässt sich ableiten, dass

Enterozyten in der Lage sind, durch HLA-DR-präsentierte Peptide eine T-Zellproliferation und dadurch eine Immunreaktion zu induzieren. Da Enterozyten auf ihrer Oberfläche weder CD80 noch CD86 exprimieren, würde eine Interaktion von T-Zellen ohne kostimulatorischen Faktor zu einer Anergie führen. Allerdings wird in diesem Zusammenhang auch eine kostimulatorische Rolle von CD58 diskutiert, das auf Enterozyten exprimiert wird und mit CD2 von T-Zellen interagieren kann [175]. Zudem wurde gezeigt, dass T-Zellen der *Lamina propria* konstitutiv durch eine Interaktion von CD2 und CD58 aktiviert werden [176]. In weiteren Untersuchungen wäre noch zu klären, ob immunogene Gliadinpeptide auch über HLA-DR an der Oberfläche von Enterozyten präsentiert werden können und ob eine Interaktion mit spezifischen T-Zell-Klonen auch in diesem Fall zu einer Proliferation dieser Zellen führen würde. Da inflammatorische Zustände, wie sie auch bei einer aktiven Zöliakie anzutreffen sind, zu einer erhöhten Oberflächenexpression von HLA-DR auf Enterozyten führen, wäre auch eine vermehrte Proliferation von gliadinspezifischen T-Zellen zu erwarten. Folglich würde sich die Frage stellen, ob eine Interaktion mit T-Zellen zu einer pro- oder antiinflammatorischen Immunantwort führen würde, da ein Großteil der T-Zellen in der *Lamina propria* einen tolerogenen Charakter aufweisen [177].

Zusammenfassend lässt sich aus den erzielten Ergebnissen entsprechend Abb. 6-2 ein Modell konstruieren, das die wesentlichen Erkenntnisse der vorliegenden Arbeit darlegt. Dabei erfolgt eine teilweise Spaltung der Gliadinpeptide P31-43 und P56-68 durch Membranpeptidasen. P56-68 bzw. dessen Fragmente gelangen über endozytotische Aufnahme in späte Endosome und werden im endozytotischen Weg weiter abgebaut und auf der Oberfläche von Enterozyten über HLA-DR an CD4<sup>+</sup> T-Zellen präsentiert. Abhängig von kostimulatorischen Faktoren und vom T-Zell-Phänotyp könnte eine inflammatorische Immunantwort oder eine Toleranzreaktion ausgelöst werden. Dagegen verbleibt P31-43 in frühen Endosomen und entgeht einer endosomalen Degradation, wodurch das toxische Peptid durch transzellulären Transport die epitheliale Barriere überwinden kann. Reguliert durch *Tight Junctions* stellt der parazelluläre Transport eine weitere Möglichkeit zur Überwindung der epithelialen Barriere dar. Die inflammationsbedingte Zerstörung von Epithelzellen

eröffnet einen zusätzlichen Weg, die epitheliale Barriere zu passieren. P31-43, das in größerer Menge die Barriere überwinden konnte, interagiert mit DC und führt zur erhöhten Sekretion der inflammatorischen Zytokine IL-8 und TNF- $\alpha$ .

Somit konnte gezeigt werden, dass eine inflammatorische Wirkung von toxischen Gliadinpeptiden durch DC vermittelt werden kann. Inwieweit Gliadinpeptide durch Enterozyten präsentiert werden können und ob daraus eine Stimulation von T-Zellen hervorgehen kann ist noch nicht abschließend geklärt.



**Abb. 6-2:** Modell zum Transport von immunogenen und toxischen Gliadinpeptiden über die epitheliale Barriere und deren Wirkung auf das Immunsystem, abgeleitet von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit. EE: frühes Endosom; LE: spätes Endosom; TJ: *Tight Junction*.



## 7 Zusammenfassung

Zöliakie wird als eine immunvermittelte, systemische Erkrankung definiert, die sich in genetisch prädisponierten Personen nach Verzehr von Gluten und verwandten Prolaminen manifestieren kann. Ein entscheidender Schritt in der Pathogenese der Zöliakie ist die Überwindung der intestinalen epithelialen Barriere durch aus Gluten abgeleitete immunogene und toxische Gliadinpeptide und nachfolgende Interaktionen mit dem Immunsystem. Über den zugrundeliegenden Mechanismus des epithelialen Transports von Gliadinpeptiden ist bisher wenig bekannt. Nach Überwindung der epithelialen Barriere treffen Gliadinpeptide zunächst auf Zellen des Immunsystems, in welchem Zusammenhang dendritische Zellen als antigenpräsentierende Zellen vermutlich eine zentrale Rolle in der Ausbildung der Gliadin-vermittelten Immunantwort spielen. Daneben besitzen aber auch Enterozyten die Fähigkeit zur Präsentation von Antigenen, wobei ihnen eher eine Beteiligung an der Entwicklung der oralen Toleranz zugesprochen wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Translokation der fluoreszenzmarkierten toxischen bzw. immunogenen Gliadinpeptide P31-43 und P56-68 in humanen Enterozyten (Caco-2-Zellen), die auf semipermeablen Filtereinsätzen kultiviert wurden, mittels Fluoreszenzspektroskopie, Durchflusszytometrie, konfokaler Mikroskopie und Massenspektrometrie untersucht. Aufbauend darauf wurde der Einfluss von immunogenen und toxischen Gliadinpeptiden auf die Reifung und Zytokinsekretion von dendritischen Zellen mittels Durchflusszytometrie und ELISA analysiert. Außerdem sollte durch Einsatz eines Proliferationsassays der Frage nachgegangen werden, ob Enterozyten über die Präsentation von Antigenen mittels HLA-DR zur Induktion von Immunzellen befähigt sind.

Massenspektrometrisch konnte gezeigt werden, dass neben einer transzellulären Aufnahme der Peptide auch eine zeitabhängige Degradation beider Peptide auf der apikalen Membranseite stattfindet. Lediglich ein geringer Anteil der Peptide konnte intakt die epitheliale Barriere überwinden. Dennoch stimulierte eine anschließende Inkubation mit dem basalen Zellmedium der Caco-2-Zellen, die mit P31-43 inkubiert worden waren, die Reifung dendritischer Zellen. Auf die Sekretion inflammatorischer (IL-8 und TNF- $\alpha$ ) oder antiinflammatorischer Zytokine (TGF- $\beta$ ) hatte basales Zellmedium allerdings keinen Einfluss, unabhängig davon, ob eine Inkubation der Enterozyten mit P31-43 oder P56-68 vorgenommen worden war. Dagegen führte die

Inkubation mit P31-43 ohne Enterozytenkontakt im Gegensatz zu P56-68 zu einer gesteigerten Sekretion inflammatorischer Zytokine. Neben der Fähigkeit des Antigentransports über intestinale Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass Enterozyten durch die Präsentation von Peptiden die Proliferation HLA-DR-spezifischer T-Zellen fördern. Inwieweit Gliadinpeptide einen ähnlichen Effekt ausüben, ist noch nicht abschließend geklärt.

Zusammenfassend konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass kurzkettige immunogene und toxische Gliadinpeptide bereits vor dem enterozytären Transport an der apikalen Membran dieser Zellen abgebaut werden. Außerdem wurde beobachtet, dass geringe Mengen dieser Peptide die epitheliale Barriere überwinden und toxische Gliadinpeptide über dendritische Zellen eine inflammatorische Immunantwort vermitteln können.

## 8 Summary

Celiac disease is defined as an autoimmune disorder in which the immune system of genetically predisposed individuals reacts abnormally sensitive to gluten and related prolamins. Overcoming the intestinal epithelial barrier by gluten derived immunogenic and toxic gliadin peptides and their subsequent interaction with the immune system is a critical step in the pathogenesis of celiac disease. Up to now, underlying mechanisms of the epithelial transport of gliadin peptides are largely unknown. After crossing the epithelial barrier, gliadin peptides get in contact with cells of the immune system with dendritic cells playing a central role in the formation of a gliadin triggered immune response. In addition to the function as an epithelial barrier enterocytes have the ability to present antigens. In this context, however, they are presumed to play a role in the development of an oral tolerance.

In the present work the epithelial translocation of gliadin peptides, the fluorescence labeled toxic P31-43 and the immunogenic P56-68, was investigated in human enterocytes (Caco-2 cells, cultivated on semi-permeable filter membranes) using fluorescence spectroscopy, flow cytometry, confocal microscopy and mass spectrometry. Based on these experiments, the influence of immunogenic and toxic gliadin peptides on the maturation and cytokine secretion of dendritic cells was measured by flow cytometry and ELISA. Furthermore, the capability of enterocytes to induce the proliferation of immune cells by presentation of antigens via HLA-DR was determined by using proliferation assays.

In addition to the transcellular uptake of peptides, mass spectrometry revealed a time dependent degradation of both peptides on the apical side of the membrane. Only a small percentage of the peptides were able to pass the epithelial barrier in an intact form. However, the subsequent incubation with the basal cell media of Caco-2 cells which had been incubated with P31-43 induced a maturation of dendritic cells. No influence, however, was found on their secretion of inflammatory (IL-8 and TNF- $\alpha$ ) and anti-inflammatory cytokines (TGF- $\beta$ ) with basal cell media of Caco-2 cells incubated neither with P31-43 nor with P56-68. In contrast, incubation with P31-43 without enterocyte contact induced an increased secretion of inflammatory cytokines, which was not the case for P56-68. Besides their ability of antigen transport enterocytes were shown to promote the proliferation of HLA-DR specific T-cells by

---

the presentation of peptides. Whether gliadin peptides exert similar effects on T-cell proliferation has not been clarified yet.

In summary, the present work revealed that short chained immunogenic and toxic gliadin peptides are degraded on the apical membrane of enterocytes prior to the epithelial transport. However, small percentages of these peptides were able to pass the epithelial barrier with toxic gliadin peptides inducing an inflammatory immune response mediated by dendritic cells.

## 9 Perspektiven

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, dass nur ein geringer Teil der getesteten immunogenen und toxischen Gliadinpeptide eine epitheliale Barriere intakt überwinden konnte. Dagegen wurde eine Vielzahl von Peptidfragmenten identifiziert. Entsprechend der Literatur vermitteln die beobachteten Fragmente des immunogenen Gliadinpeptids P56-68 bei Zöliakie-Patienten keine oder nur sehr geringe Immunogenität [167]. Für die Fragmente des toxischen Peptids P31-43 kann bisher keine Aussage zur Toxizität getroffen werden, da der Mechanismus für die toxische Wirkung dieser Peptide bisher noch unbekannt ist. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass das getestete toxische Gliadinpeptid P31-43 nach 24-stündiger Inkubation zu einem Anstieg der Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch DC führt. Dagegen führten die getesteten basalen Inkubationsmedien, in denen sich geringe Mengen an P31-43 sowie Fragmente dieses Peptids befanden, über die gleiche Inkubationszeit zu keinem Einfluss auf die getestete Zytokinsekretion. Ein weiterführender Ansatz wäre die Untersuchung von Fragmenten in einer höheren Konzentration bezüglich ihres Einflusses auf die Zytokinsekretion von DC. Ergänzend wäre von Interesse, ob diese Fragmente wie intaktes P31-43 zu einer Induktion der IL-15-Synthese und einer vermehrten Apoptose von Enterozyten in Biopsien von Zöliakie-Patienten führen und ob weitere Einflussfaktoren, wie inflammatorische Zytokine, in Kombination mit Gliadinpeptiden die Reifung von DC verstärken und deren Zytokinsekretion fördern. Maiuri et al [178] zeigten an Biopsien von Zöliakie-Patienten, dass toxische und immunogene Gliadinpeptide synergetische Effekte bei der Aktivierung von T-Zellen ausüben. Inwieweit der in der vorliegenden Arbeit beobachtete Einfluss von toxischem P31-43 auf DC deren Interaktion mit T-Zellen noch steigert, ist noch nicht geklärt.

Neben der Interaktion mit DC rückten auch die potentiellen Wechselwirkungen von T-Zellen mit Enterozyten in das Interesse der Zöliakieforschung. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Enterozyten zur Stimulation der T-Zell-Proliferation befähigt sind. Da zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung kein T-Zell-Klon verfügbar war, der spezifisch mit HLA-DR präsentierten Gliadinpeptiden interagiert, blieb die Frage offen, ob Enterozyten tatsächlich zur Präsentation von Gliadinpeptiden befähigt sind. Ausgehend von der Beobachtung, dass Enterozyten

---

die Proliferation von T-Zellen induzieren können, wäre es von Interesse zu wissen, ob auch die Präsentation von Gliadinpeptiden zur gesteigerten Proliferation von T-Zellen des inflammatorischen oder regulatorischen Phänotyps führen würde. Hierfür müssten allerdings spezifische T-Zell-Klone isoliert werden, die mit Gliadinpeptiden interagieren, die von HLA-Molekülen auf der Oberfläche von Enterozyten präsentiert werden.

## 10 Literaturverzeichnis

1. Husby S, Koletzko S, Korponay-Szabo IR, Mearin ML, Phillips A et al. (2012) European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 54 (1): 136–160.
2. Tjon JM, van Bergen J, Koning F (2010) Celiac disease. how complicated can it get. *Immunogenetics* 62 (10): 641–651.
3. Sollid LM (2002) Coeliac disease. dissecting a complex inflammatory disorder. *Nat Rev Immunol* 2 (9): 647–655.
4. Rewers M (2005) Epidemiology of celiac disease. what are the prevalence, incidence, and progression of celiac disease. *Gastroenterology* 128 (4 Suppl 1): S47-51.
5. Fasano A (2008) *Frontiers in celiac disease*. Basel: Karger. 222 p.
6. Kneepkens CM, von Blomberg, B. M. (2012) Clinical practice. coeliac disease. *Eur J Pediatr* 171 (7): 1011–1021.
7. Tack GJ, Verbeek WH, Schreurs MW, Mulder CJ (2010) The spectrum of celiac disease. epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7 (4): 204–213.
8. Keller KM (2003) Klinische Symptomatik. "Zöliakie, ein Eisberg". *Monatsschr Kinderheilkd* 151 (7): 706–714.
9. Stepniak D, Koning F (2006) Celiac disease--sandwiched between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol* 67 (6): 460–468.
10. Abadie V, Sollid LM, Barreiro LB, Jabri B (2011) Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 29: 493–525.
11. Choo SY (2007) The HLA system. genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med J* 48 (1): 11–23.
12. Koning F, Schuppan D, Cerf-Bensussan N, Sollid LM (2005) Pathomechanisms in celiac disease. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 19 (3): 373–387.
13. Hourigan CS (2006) The molecular basis of coeliac disease. *Clin Exp Med* 6 (2): 53–59.
14. Meresse B, Malamut G, Cerf-Bensussan N (2012) Celiac disease. an immunological jigsaw. *Immunity* 36 (6): 907–919.

15. Lundin KE, Scott H, Fausa O, Thorsby E, Sollid LM (1994) T cells from the small intestinal mucosa of a DR4, DQ7/DR4, DQ8 celiac disease patient preferentially recognize gliadin when presented by DQ8. *Hum Immunol* 41 (4): 285–291.
16. Lundin KE, Scott H, Hansen T, Paulsen G, Halstensen TS et al. (1993) Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1\*0501,beta 1\*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients. *J Exp Med* 178 (1): 187–196.
17. Henderson KN, Tye-Din JA, Reid HH, Chen Z, Borg NA et al. (2007) A structural and immunological basis for the role of human leukocyte antigen DQ8 in celiac disease. *Immunity* 27 (1): 23–34.
18. Karell K, Louka AS, Moodie SJ, Ascher H, Clot F et al. (2003) HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease. *Hum. Immunol.* 64 (4): 469–477.
19. Megiorni F, Pizzuti A (2012) HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition. practical implications of the HLA molecular typing. *J Biomed Sci* 19: 88.
20. Romanos J, van Diemen, C. C., Nolte IM, Trynka G, Zhernakova A et al. (2009) Analysis of HLA and non-HLA alleles can identify individuals at high risk for celiac disease. *Gastroenterology* 137 (3): 834-40, 840 e1-3.
21. Garner CP, Murray JA, Ding YC, Tien Z, van Heel, D. A. et al. (2009) Replication of celiac disease UK genome-wide association study results in a US population. *Hum Mol Genet* 18 (21): 4219–4225.
22. Einarsdottir E, Koskinen LL, de Kauwe, A. L., Dukes E, Mustalahti K et al. (2011) Genome-wide analysis of extended pedigrees confirms IL2-IL21 linkage and shows additional regions of interest potentially influencing coeliac disease risk. *Tissue Antigens* 78 (6): 428–437.
23. Plaza-Izurieta L, Castellanos-Rubio A, Irastorza I, Fernandez-Jimenez N, Gutierrez G et al. (2011) Revisiting genome wide association studies (GWAS) in coeliac disease. replication study in Spanish population and expression analysis of candidate genes. *J Med Genet* 48 (7): 493–496.
24. Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V et al. (2011) Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nat Genet* 43 (12): 1193–1201.



25. Gallagher E, Gormley TR, Arendt E.K. (2004) Recent advances in the formulation of gluten-free cereal-based products. *Trends Food Sci Technol* 15: 143–152.
26. Osborne TB (1908) OUR PRESENT KNOWLEDGE OF PLANT PROTEINS. *Science* 28 (718): 417–427.
27. Tatham AS, Shewry PR (2008) Allergens to wheat and related cereals. *Clin Exp Allergy* 38 (11): 1712–1726.
28. Wieser H (2007) Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol* 24 (2): 115–119.
29. Ciccocioppo R, Di Sabatino A, Corazza GR (2005) The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin Exp Immunol* 140 (3): 408–416.
30. Di Sabatino A, Vanoli A, Giuffrida P, Luinetti O, Solcia E et al. (2012) The function of tissue transglutaminase in celiac disease. *Autoimmun Rev* 11 (10): 746–753.
31. van de Wal, Y., Kooy YM, van Veelen P, Vader W, August SA et al. (1999) Glutenin is involved in the gluten-driven mucosal T cell response. *Eur J Immunol* 29 (10): 3133–3139.
32. Molberg O, Solheim Flaete N, Jensen T, Lundin KE, Arentz-Hansen H et al. (2003) Intestinal T-cell responses to high-molecular-weight glutenins in celiac disease. *Gastroenterology* 125 (2): 337–344.
33. Janatuinen EK, Kempainen TA, Julkunen RJ, Kosma VM, Maki M et al. (2002) No harm from five year ingestion of oats in coeliac disease. *Gut* 50 (3): 332–335.
34. Vader LW, Stepniak DT, Bunnik EM, Kooy YM, Haan W de et al. (2003) Characterization of cereal toxicity for celiac disease patients based on protein homology in grains. *Gastroenterology* 125 (4): 1105–1113.
35. Hoffenberg EJ, Haas J, Drescher A, Barnhurst R, Osberg I et al. (2000) A trial of oats in children with newly diagnosed celiac disease. *J Pediatr* 137 (3): 361–366.
36. Arentz-Hansen H, Fleckenstein B, Molberg O, Scott H, Koning F et al. (2004) The molecular basis for oat intolerance in patients with celiac disease. *PLoS Med* 1 (1): e1.
37. Kilmartin C, Lynch S, Abuzakouk M, Wieser H, Feighery C (2003) Avenin fails to induce a Th1 response in coeliac tissue following in vitro culture. *Gut* 52 (1): 47–52.

38. Codex committee on nutrition and foods for special dietary uses (2008) Standard for foods for special dietary use for persons intolerant to gluten. Codex standard 118 - 1979. Available:  
[http://www.codexalimentarius.org/download/standards/291/cxs\\_118e.pdf](http://www.codexalimentarius.org/download/standards/291/cxs_118e.pdf).  
Accessed 7 July 2014.
39. Rescigno M, Rotta G, Valzasina B, Ricciardi-Castagnoli P (2001) Dendritic cells shuttle microbes across gut epithelial monolayers. *Immunobiology* 204 (5): 572–581.
40. Menard S, Cerf-Bensussan N, Heyman M (2010) Multiple facets of intestinal permeability and epithelial handling of dietary antigens. *Mucosal Immunol* 3 (3): 247–259.
41. Snoeck V, Goddeeris B, Cox E (2005) The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect* 7 (7-8): 997–1004.
42. Pappenheimer JR, Dahl CE, Karnovsky ML, Maggio JE (1994) Intestinal absorption and excretion of octapeptides composed of D amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (5): 1942–1945.
43. Neal MD, Leaphart C, Levy R, Prince J, Billiar TR et al. (2006) Enterocyte TLR4 mediates phagocytosis and translocation of bacteria across the intestinal barrier. *J Immunol* 176 (5): 3070–3079.
44. Mercer J, Helenius A (2009) Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* 11 (5): 510–520.
45. Conner SD, Schmid SL (2003) Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422 (6927): 37–44.
46. Czerkinsky C, Russell MW, Lycke N, Lindblad M, Holmgren J (1989) Oral administration of a streptococcal antigen coupled to cholera toxin B subunit evokes strong antibody responses in salivary glands and extramucosal tissues. *Infect Immun* 57 (4): 1072–1077.
47. McKenzie SJ, Halsey JF (1984) Cholera toxin B subunit as a carrier protein to stimulate a mucosal immune response. *J Immunol* 133 (4): 1818–1824.
48. Arakawa T, Yu J, Chong DK, Hough J, Engen PC et al. (1998) A plant-based cholera toxin B subunit-insulin fusion protein protects against the development of autoimmune diabetes. *Nat Biotechnol* 16 (10): 934–938.

49. Sun JB, Holmgren J, Czerkinsky C (1994) Cholera toxin B subunit. an efficient transmucosal carrier-delivery system for induction of peripheral immunological tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (23): 10795–10799.
50. Wernick NL, Chinnapen DJ, Cho JA, Lencer WI (2010) Cholera toxin. an intracellular journey into the cytosol by way of the endoplasmic reticulum. *Toxins (Basel)* 2 (3): 310–325.
51. Schurmann G, Bruwer M, Klotz A, Schmid KW, Senninger N et al. (1999) Transepithelial transport processes at the intestinal mucosa in inflammatory bowel disease. *Int J Colorectal Dis* 14 (1): 41–46.
52. Terpend K, Boisgerault F, Blaton MA, Desjeux JF, Heyman M (1998) Protein transport and processing by human HT29-19A intestinal cells. effect of interferon gamma. *Gut* 42 (4): 538–545.
53. Soderholm JD, Streutker C, Yang PC, Paterson C, Singh PK et al. (2004) Increased epithelial uptake of protein antigens in the ileum of Crohn's disease mediated by tumour necrosis factor alpha. *Gut* 53 (12): 1817–1824.
54. Huotari J, Helenius A (2011) Endosome maturation. *EMBO J* 30 (17): 3481–3500.
55. Snoeck V, Goddeeris B, Cox E (2005) The role of enterocytes in the intestinal barrier function and antigen uptake. *Microbes Infect* 7 (7-8): 997–1004.
56. Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10 (8): 513–525.
57. Hundorfean G, Zimmer KP, Strobel S, Gebert A, Ludwig D et al. (2007) Luminal antigens access late endosomes of intestinal epithelial cells enriched in MHC I and MHC II molecules. in vivo study in Crohn's ileitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 293 (4): G798-808.
58. van Niel G, Heyman M (2002) The epithelial cell cytoskeleton and intracellular trafficking. II. Intestinal epithelial cell exosomes. perspectives on their structure and function. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283 (2): G251-5.
59. Haase H, Kruse A, Rink L (2012) Immunologie für Einsteiger. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
60. Pfeffer K (2003) Biological functions of tumor necrosis factor cytokines and their receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14 (3-4): 185–191.

61. Przemioslo RT, Kontakou M, Nobili V, Ciclitira PJ (1994) Raised pro-inflammatory cytokines interleukin 6 and tumour necrosis factor alpha in coeliac disease mucosa detected by immunohistochemistry. *Gut* 35 (10): 1398–1403.
62. Kontakou M, Przemioslo RT, Sturgess RP, Limb AG, Ciclitira PJ (1995) Expression of tumour necrosis factor-alpha, interleukin-6, and interleukin-2 mRNA in the jejunum of patients with coeliac disease. *Scand. J. Gastroenterol.* 30 (5): 456–463.
63. Mukaida N, Harada A, Matsushima K (1998) Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9 (1): 9–23.
64. Brottveit M, Beitnes AR, Tollefsen S, Bratlie JE, Jahnsen FL et al. (2013) Mucosal cytokine response after short-term gluten challenge in celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *Am. J. Gastroenterol.* 108 (5): 842–850.
65. Cools N, Van Tendeloo, V. F., Smits EL, Lenjou M, Nijs G et al. (2008) Immunosuppression induced by immature dendritic cells is mediated by TGF-beta/IL-10 double-positive CD4+ regulatory T cells. *J Cell Mol Med* 12 (2): 690–700.
66. Mahlke K, editor (2009) *Janeway Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
67. Qiao SW, Iversen R, Raki M, Sollid LM (2012) The adaptive immune response in celiac disease. *Semin Immunopathol* 34 (4): 523–540.
68. Schütt C, Bröker B (2011) *Grundwissen Immunologie*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
69. Mowat AM (2003) Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. *Nat Rev Immunol* 3 (4): 331–341.
70. Guha S, Padh H (2008) Cathepsins. fundamental effectors of endolysosomal proteolysis. *Indian J Biochem Biophys* 45 (2): 75–90.
71. Hausch F, Shan L, Santiago NA, Gray GM, Khosla C (2002) Intestinal digestive resistance of immunodominant gliadin peptides. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 283 (4): G996-G1003.
72. Sturgess R, Day P, Ellis HJ, Lundin KE, Gjertsen HA et al. (1994) Wheat peptide challenge in coeliac disease. *Lancet* 343 (8900): 758–761.

- 
73. Hue S, Mention JJ, Monteiro RC, Zhang S, Cellier C et al. (2004) A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21 (3): 367–377.
  74. Maiuri L, Picarelli A, Boirivant M, Coletta S, Mazzilli MC et al. (1996) Definition of the initial immunologic modifications upon in vitro gliadin challenge in the small intestine of celiac patients. *Gastroenterology* 110 (5): 1368–1378.
  75. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V et al. (2003) Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 362 (9377): 30–37.
  76. van Heel, D. A., West J (2006) Recent advances in coeliac disease. *Gut* 55 (7): 1037–1046.
  77. Gianfrani C, Auricchio S, Troncone R (2005) Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunol Lett* 99 (2): 141–145.
  78. Fujii S, Liu K, Smith C, Bonito AJ, Steinman RM (2004) The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J Exp Med* 199 (12): 1607–1618.
  79. Palova-Jelinkova L, Rozkova D, Pecharova B, Bartova J, Sediva A et al. (2005) Gliadin fragments induce phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *J Immunol* 175 (10): 7038–7045.
  80. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S et al. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 18: 767–811.
  81. Cinova J, Palova-Jelinkova L, Smythies LE, Cerna M, Pecharova B et al. (2007) Gliadin peptides activate blood monocytes from patients with celiac disease. *J Clin Immunol* 27 (2): 201–209.
  82. Jelinkova L, Tuckova L, Cinova J, Flegelova Z, Tlaskalova-Hogenova H (2004) Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF-alpha through a mechanism involving NF-kappaB. *FEBS Lett* 571 (1-3): 81–85.
  83. Rakhimova M, Esslinger B, Schulze-Krebs A, Hahn EG, Schuppan D et al. (2009) In vitro differentiation of human monocytes into dendritic cells by peptic-tryptic digest of gliadin is independent of genetic predisposition and the presence of celiac disease. *J Clin Immunol* 29 (1): 29–37.

84. Nikulina M, Habich C, Flohe SB, Scott FW, Kolb H (2004) Wheat gluten causes dendritic cell maturation and chemokine secretion. *J Immunol* 173 (3): 1925–1933.
85. Hershberg RM, Mayer LF (2000) Antigen processing and presentation by intestinal epithelial cells - polarity and complexity. *Immunol Today* 21 (3): 123–128.
86. Hershberg RM, Cho DH, Youakim A, Bradley MB, Lee JS et al. (1998) Highly polarized HLA class II antigen processing and presentation by human intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 102 (4): 792–803.
87. Hershberg RM, Framson PE, Cho DH, Lee LY, Kovats S et al. (1997) Intestinal epithelial cells use two distinct pathways for HLA class II antigen processing. *J Clin Invest* 100 (1): 204–215.
88. Kaiserlian D, Vidal K, Revillard JP (1989) Murine enterocytes can present soluble antigen to specific class II-restricted CD4<sup>+</sup> T cells. *Eur J Immunol* 19 (8): 1513–1516.
89. Mayrhofer G, Spargo LD (1990) Distribution of class II major histocompatibility antigens in enterocytes of the rat jejunum and their association with organelles of the endocytic pathway. *Immunology* 70 (1): 11–19.
90. Jackman MR, Shurety W, Ellis JA, Luzio JP (1994) Inhibition of apical but not basolateral endocytosis of ricin and folate in Caco-2 cells by cytochalasin D. *J. Cell. Sci.* 107 ( Pt 9): 2547–2556.
91. Georgiou M, Marinari E, Burden J, Baum B (2008) Cdc42, Par6, and aPKC regulate Arp2/3-mediated endocytosis to control local adherens junction stability. *Curr. Biol.* 18 (21): 1631–1638.
92. Buning J, Schmitz M, Repenning B, Ludwig D, Schmidt MA et al. (2005) Interferon-gamma mediates antigen trafficking to MHC class II-positive late endosomes of enterocytes. *Eur J Immunol* 35 (3): 831–842.
93. Wolf PR, Ploegh HL (1995) How MHC class II molecules acquire peptide cargo. biosynthesis and trafficking through the endocytic pathway. *Annu Rev Cell Dev Biol* 11: 267–306.
94. Neefjes J, Jongsma ML, Paul P, Bakke O (2011) Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 11 (12): 823–836.

95. Pabst O, Mowat AM (2012) Oral tolerance to food protein. *Mucosal Immunol* 5 (3): 232–239.
96. Weiner HL, da Cunha, A. P., Quintana F, Wu H (2011) Oral tolerance. *Immunol Rev* 241 (1): 241–259.
97. Castro-Sanchez P, Martin-Villa JM (2013) Gut immune system and oral tolerance. *Br J Nutr* 109 Suppl 2: S3-11.
98. Miron N, Cristea V (2012) Enterocytes. active cells in tolerance to food and microbial antigens in the gut. *Clin Exp Immunol* 167 (3): 405–412.
99. Chen X, Song CH, Feng BS, Li TL, Li P et al. (2011) Intestinal epithelial cell-derived integrin alphabeta6 plays an important role in the induction of regulatory T cells and inhibits an antigen-specific Th2 response. *J Leukoc Biol* 90 (4): 751–759.
100. Heyman M, Abed J, Lebreton C, Cerf-Bensussan N (2011) Intestinal permeability in coeliac disease. insight into mechanisms and relevance to pathogenesis. *Gut*.
101. Rousset M (1986) The human colon carcinoma cell lines HT-29 and Caco-2. two in vitro models for the study of intestinal differentiation. *Biochimie* 68 (9): 1035–1040.
102. Forgue-Lafitte ME, Coudray AM, Breant B, Mester J (1989) Proliferation of the human colon carcinoma cell line HT29. autocrine growth and deregulated expression of the c-myc oncogene. *Cancer Res* 49 (23): 6566–6571.
103. Arpin M, Blair L, Coudrier E, Dudouet B, Finidori J et al. (1988) Villin, a specific marker for some epithelia specialized in transport, to study the differentiation of intestinal and kidney cells in vivo and in a human colon adenocarcinoma line HT29 in culture. *Mol Aspects Med* 10 (3): 257–272.
104. Cohen E, Ophir I, Shaul YB (1999) Induced differentiation in HT29, a human colon adenocarcinoma cell line. *J Cell Sci* 112 ( Pt 16): 2657–2666.
105. Sambuy Y, Angelis I de, Ranaldi G, Scarino ML, Stamatii A et al. (2005) The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier. influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* 21 (1): 1–26.
106. Vachon PH, Beaulieu JF (1992) Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* 103 (2): 414–423.

107. Musch MW, Kaplan B, Chang EB (2001) Role of increased basal expression of heat shock protein 72 in colonic epithelial c2BBE adenocarcinoma cells. *Cell Growth Differ.* 12 (8): 419–426.
108. Ranaldi G, Consalvo R, Sambuy Y, Scarino ML (2003) Permeability characteristics of parental and clonal human intestinal Caco-2 cell lines differentiated in serum-supplemented and serum-free media. *Toxicol In Vitro* 17 (5-6): 761–767.
109. Ferruzza S, Rossi C, Scarino ML, Sambuy Y (2012) A protocol for differentiation of human intestinal Caco-2 cells in asymmetric serum-containing medium. *Toxicol In Vitro* 26 (8): 1252–1255.
110. Amblard M, Fehrentz JA, Martinez J, Subra G (2006) Methods and protocols of modern solid phase Peptide synthesis. *Mol Biotechnol* 33 (3): 239–254.
111. Arampatzi S (2013) Synthese farstoffmarkierter Gliadinpeptide zur Untersuchung intrazellulärer Transportprozesse im Rahmen von Zöliakie. Gießen.
112. Rodriguez-Gonzalez FG, Mustafa DA, Mostert B, Sieuwerts AM (2013) The challenge of gene expression profiling in heterogeneous clinical samples. *Methods* 59 (1): 47–58.
113. Thiel A, Scheffold A, Radbruch A (1998) Immunomagnetic cell sorting--pushing the limits. *Immunotechnology* 4 (2): 89–96.
114. Chetty R, Gatter K (1994) CD3: structure, function, and role of immunostaining in clinical practice. *J. Pathol.* 173 (4): 303–307.
115. Zhou LJ, Ord DC, Hughes AL, Tedder TF (1991) Structure and domain organization of the CD19 antigen of human, mouse, and guinea pig B lymphocytes. Conservation of the extensive cytoplasmic domain. *J. Immunol.* 147 (4): 1424–1432.
116. Ziegler-Heitbrock L, Ancuta P, Crowe S, Dalod M, Grau V et al. (2010) Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood* 116 (16): e74-80.
117. Hiasa M, Abe M, Nakano A, Oda A, Amou H et al. (2009) GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *Blood* 114 (20): 4517–4526.



118. Cao W, Lee SH, Lu J (2005) CD83 is preformed inside monocytes, macrophages and dendritic cells, but it is only stably expressed on activated dendritic cells. *Biochem. J.* 385 (Pt 1): 85–93.
119. Mann M, Hendrickson RC, Pandey A (2001) Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annu Rev Biochem* 70: 437–473.
120. Hu VW, Black GE, Torres-Duarte A, Abramson FP (2002) 3H-thymidine is a defective tool with which to measure rates of DNA synthesis. *FASEB J.* 16 (11): 1456–1457.
121. Daniel H (2004) Molecular and integrative physiology of intestinal peptide transport. *Annu Rev Physiol* 66: 361–384.
122. Shan L, Molberg O, Parrot I, Hausch F, Filiz F et al. (2002) Structural basis for gluten intolerance in celiac sprue. *Science* 297 (5590): 2275–2279.
123. Mamone G, Ferranti P, Rossi M, Roepstorff P, Fierro O et al. (2007) Identification of a peptide from alpha-gliadin resistant to digestive enzymes. implications for celiac disease. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 855 (2): 236–241.
124. Barone MV, Nanayakkara M, Paoletta G, Maglio M, Vitale V et al. (2010) Gliadin peptide P31-43 localises to endocytic vesicles and interferes with their maturation. *PLoS One* 5 (8): e12246.
125. Friis S, Dabelsteen E, Sjoström H, Noren O, Jarnum S (1992) Gliadin uptake in human enterocytes. Differences between coeliac patients in remission and control individuals. *Gut* 33 (11): 1487–1492.
126. Lubbing N, Barone MV, Rudloff S, Troncone R, Auricchio S et al. (2011) Correction of gliadin transport within enterocytes through celiac disease serum. *Pediatr Res* 70 (4): 357–362.
127. Zimmer KP, Fischer I, Mothes T, Weissen-Plenz G, Schmitz M et al. (2010) Endocytotic segregation of gliadin peptide 31-49 in enterocytes. *Gut* 59 (3): 300–310.
128. Heyman M, Menard S (2009) Pathways of gliadin transport in celiac disease. *Ann N Y Acad Sci* 1165: 274–278.
129. Uc A, Britigan BE (2003) Does heme oxygenase-1 have a role in Caco-2 cell cycle progression. *Exp Biol Med (Maywood)* 228 (5): 590–595.

130. Matysiak-Budnik T, Candalh C, Dugave C, Namane A, Cellier C et al. (2003) Alterations of the intestinal transport and processing of gliadin peptides in celiac disease. *Gastroenterology* 125 (3): 696–707.
131. Menard S, Lebreton C, Schumann M, Matysiak-Budnik T, Dugave C et al. (2012) Paracellular versus transcellular intestinal permeability to gliadin peptides in active celiac disease. *Am J Pathol* 180 (2): 608–615.
132. Schumann M, Richter JF, Wedell I, Moos V, Zimmermann-Kordmann M et al. (2008) Mechanisms of epithelial translocation of the alpha(2)-gliadin-33mer in coeliac sprue. *Gut* 57 (6): 747–754.
133. Iacomino G, Fierro O, D'Auria S, Picariello G, Ferranti P et al. (2013) Structural analysis and Caco-2 cell permeability of the celiac-toxic A-gliadin peptide 31-55. *J Agric Food Chem* 61 (5): 1088–1096.
134. Rodal SK, Skretting G, Garred O, Vilhardt F, van Deurs B et al. (1999) Extraction of cholesterol with methyl-beta-cyclodextrin perturbs formation of clathrin-coated endocytic vesicles. *Mol Biol Cell* 10 (4): 961–974.
135. Weangsripanaval T, Murota K, Murakami Y, Kominami M, Kusudo T et al. (2006) Sodium cromoglycate inhibits absorption of the major soybean allergen, Gly m Bd 30K, in mice and human intestinal Caco-2 cells. *J Nutr* 136 (11): 2874–2880.
136. Vercauteren D, Vandenbroucke RE, Jones AT, Rejman J, Demeester J et al. (2010) The use of inhibitors to study endocytic pathways of gene carriers. optimization and pitfalls. *Mol Ther* 18 (3): 561–569.
137. Leterrier C, Lainé J, Darmon M, Boudin H, Rossier J et al. (2006) Constitutive activation drives compartment-selective endocytosis and axonal targeting of type 1 cannabinoid receptors. *J. Neurosci.* 26 (12): 3141–3153.
138. Caputo I, Barone MV, Lepretti M, Martucciello S, Nista I et al. (2010) Celiac anti-tissue transglutaminase antibodies interfere with the uptake of alpha gliadin peptide 31-43 but not of peptide 57-68 by epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1802 (9): 717–727.
139. Barone MV, Zanzi D, Maglio M, Nanayakkara M, Santagata S et al. (2011) Gliadin-mediated proliferation and innate immune activation in celiac disease are due to alterations in vesicular trafficking. *PLoS One* 6 (2): e17039.

140. Sander GR, Cummins AG, Henshall T, Powell BC (2005) Rapid disruption of intestinal barrier function by gliadin involves altered expression of apical junctional proteins. *FEBS Lett* 579 (21): 4851–4855.
141. Lammers KM, Lu R, Brownley J, Lu B, Gerard C et al. (2008) Gliadin induces an increase in intestinal permeability and zonulin release by binding to the chemokine receptor CXCR3. *Gastroenterology* 135 (1): 194-204 e3.
142. Drago S, El Asmar R, Di Pierro M, Grazia Clemente M, Tripathi A et al. (2006) Gliadin, zonulin and gut permeability. Effects on celiac and non-celiac intestinal mucosa and intestinal cell lines. *Scand J Gastroenterol* 41 (4): 408–419.
143. Clemente MG, Virgiliis S de, Kang JS, Macatagney R, Musu MP et al. (2003) Early effects of gliadin on enterocyte intracellular signalling involved in intestinal barrier function. *Gut* 52 (2): 218–223.
144. Prasad KK, Thapa BR, Nain CK, Sharma AK, Singh K (2008) Brush border enzyme activities in relation to histological lesion in pediatric celiac disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23 (8 Pt 2): e348-52.
145. Booth CC (1970) Enterocyte in coeliac disease. 1. *Br Med J* 3 (5725): 725–731.
146. Detel D, Persić M, Varljen J (2007) Serum and intestinal dipeptidyl peptidase IV (DPP IV/CD26) activity in children with celiac disease. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 45 (1): 65–70.
147. Andria G, Cucchiara S, Vizia B de, Ritis G de, Mazzacca G et al. (1980) Brush border and cytosol peptidase activities of human small intestine in normal subjects and celiac patients. *Pediatr. Res.* 14 (6): 812–818.
148. Londei M, Maiuri L (2004) Gliadin as stimulator adaptive and innate immune responses in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 39 Suppl 3: S729.
149. Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC (2003) Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 21: 685–711.
150. Bilsborough J, Viney JL (2004) Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease. *Gastroenterology* 127 (1): 300–309.
151. Mahnke K, Johnson TS, Ring S, Enk AH (2007) Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells. a two-way relationship. *J Dermatol Sci* 46 (3): 159–167.
152. Smith PD, Ochsenbauer-Jambor C, Smythies LE (2005) Intestinal macrophages. unique effector cells of the innate immune system. *Immunol Rev* 206: 149–159.

153. Raki M, Tollefsen S, Molberg O, Lundin KE, Sollid LM et al. (2006) A unique dendritic cell subset accumulates in the celiac lesion and efficiently activates gluten-reactive T cells. *Gastroenterology* 131 (2): 428–438.
154. Gijzen K, Tacke PJ, Zimmerman A, Joosten B, de Vries, I. J. et al. (2007) Relevance of DC-SIGN in DC-induced T cell proliferation. *J Leukoc Biol* 81 (3): 729–740.
155. Geijtenbeek TB, Torensma R, van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema GJ et al. (2000) Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100 (5): 575–585.
156. Puig-Kroger A, Serrano-Gomez D, Caparros E, Dominguez-Soto A, Relloso M et al. (2004) Regulated expression of the pathogen receptor dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin in THP-1 human leukemic cells, monocytes, and macrophages. *J Biol Chem* 279 (24): 25680–25688.
157. Martinez O, Brackenridge S, El-Idrissi Mel A, Prabhakar BS (2005) DC-SIGN, but not sDC-SIGN, can modulate IL-2 production from PMA- and anti-CD3-stimulated primary human CD4 T cells. *Int Immunol* 17 (6): 769–778.
158. Geijtenbeek TB, Engering A, van Kooyk Y (2002) DC-SIGN, a C-type lectin on dendritic cells that unveils many aspects of dendritic cell biology. *J Leukoc Biol* 71 (6): 921–931.
159. Coleman CM, Spearman P, Wu L (2011) Tetherin does not significantly restrict dendritic cell-mediated HIV-1 transmission and its expression is upregulated by newly synthesized HIV-1 Nef. *Retrovirology* 8: 26.
160. Relloso M, Puig-Kroger A, Pello OM, Rodriguez-Fernandez JL, de la Rosa, G. et al. (2002) DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J Immunol* 168 (6): 2634–2643.
161. Capozzi A, Vincentini O, Gizzi P, Porzia A, Longo A et al. (2013) Modulatory Effect of Gliadin Peptide 10-mer on Epithelial Intestinal CACO-2 Cell Inflammatory Response. *PLoS One* 8 (6): e66561.
162. Vincentini O, Quaranta MG, Viora M, Agostoni C, Silano M (2011) Docosahexaenoic acid modulates in vitro the inflammation of celiac disease in intestinal epithelial cells via the inhibition of cPLA2. *Clin Nutr* 30 (4): 541–546.

163. Sansom DM, Manzotti CN, Zheng Y (2003) What's the difference between CD80 and CD86. *Trends Immunol* 24 (6): 314–319.
164. Collins AV, Brodie DW, Gilbert RJ, Iaboni A, Manso-Sancho R et al. (2002) The interaction properties of costimulatory molecules revisited. *Immunity* 17 (2): 201–210.
165. Mention JJ, Ben Ahmed M, Begue B, Barbe U, Verkarre V et al. (2003) Interleukin 15. a key to disrupted intraepithelial lymphocyte homeostasis and lymphomagenesis in celiac disease. *Gastroenterology* 125 (3): 730–745.
166. van Heel, D. A. (2006) Interleukin 15. its role in intestinal inflammation. *Gut* 55 (4): 444–445.
167. Arentz-Hansen H, Korner R, Molberg O, Quarsten H, Vader W et al. (2000) The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase. *J Exp Med* 191 (4): 603–612.
168. Fais S, Maiuri L, Pallone F, Vincenzi M de, Ritis G de et al. (1992) Gliadin induced changes in the expression of MHC-class II antigens by human small intestinal epithelium. Organ culture studies with coeliac disease mucosa. *Gut* 33 (4): 472–475.
169. Clot F, Gianfrani C, Babron MC, Bouguerra F, Southwood S et al. (1999) HLA-DR53 molecules are associated with susceptibility to celiac disease and selectively bind gliadin-derived peptides. *Immunogenetics* 49 (9): 800–807.
170. Gjertsen HA, Sollid LM, Ek J, Thorsby E, Lundin KE (1994) T cells from the peripheral blood of coeliac disease patients recognize gluten antigens when presented by HLA-DR, -DQ, or -DP molecules. *Scand J Immunol* 39 (6): 567–574.
171. Zimmer KP, Poremba C, Weber P, Ciclitira PJ, Harms E (1995) Translocation of gliadin into HLA-DR antigen containing lysosomes in coeliac disease enterocytes. *Gut* 36 (5): 703–709.
172. Bloom S, Simmons D, Jewell DP (1995) Adhesion molecules intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), ICAM-3 and B7 are not expressed by epithelium in normal or inflamed colon. *Clin Exp Immunol* 101 (1): 157–163.
173. Sanderson IR, Ouellette AJ, Carter EA, Walker WA, Harmatz PR (1993) Differential regulation of B7 mRNA in enterocytes and lymphoid cells. *Immunology* 79 (3): 434–438.

- 
174. Posch PE, Hurley CK, Geluk A, Ottenhoff TH (1996) The impact of DR3 microvariation on peptide binding. the combinations of specific DR beta residues critical to binding differ for different peptides. *Hum Immunol* 49 (2): 96–105.
  175. Framson PE, Cho DH, Lee LY, Hershberg RM (1999) Polarized expression and function of the costimulatory molecule CD58 on human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* 116 (5): 1054–1062.
  176. Ebert EC (2006) CD2 activation of human lamina propria lymphocytes reduces CD3 responsiveness. *Immunology* 117 (1): 71–77.
  177. Braunstein J, Qiao L, Autschbach F, Schurmann G, Meuer S (1997) T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10. *Gut* 41 (2): 215–220.
  178. Maiuri L, Ciacci C, Ricciardelli I, Vacca L, Raia V et al. (2003) Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 362 (9377): 30–37.

## Erklärung

Hiermit versichere ich, die vorgelegte Dissertation selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt zu haben, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze gute wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der ‚Satzung der Justus-Liebig-Universität zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis‘ niedergelegt sind, eingehalten.

---

(Datum)

---

(Unterschrift)